

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 874**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010** **E 19175988 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022** **EP 3702371**

54 Título: **Anticuerpos anti-FGFR3 y métodos que utilizan los mismos**

30 Prioridad:

25.03.2009 US 16322209 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2023

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

ASHKENAZI, AVI;
QING, JING;
WIESMANN, CHRISTIAN y
WU, YIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 932 874 T3

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

Anticuerpos anti-FGFR3 y métodos que utilizan los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-FGFR3 y a usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los factores de crecimiento de fibroblastos (los FGF) y sus receptores (los FGFR) desempeñan un papel crucial durante el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular y el metabolismo (1-3). En los seres humanos, existen 22 FGF (FGF1-14, FGF16-23) y cuatro receptores de FGF con dominio de tirosina cinasa (FGFR1-4). Los FGFR consisten en una región de unión a ligando extracelular, con dos o tres dominios de tipo inmunoglobulina (IgD1-3), una región transmembranaria de un solo cruce y un dominio citoplásmico, dominio de tirosina cinasa de división. FGFR1, 2 y 3 tienen cada uno dos isoformas principales de corte y empalme alternativo, designadas IIIb y IIIc. Estas isoformas difieren en aproximadamente 50 aminoácidos en la segunda mitad de IgD3 y tienen una distribución tisular y una especificidad de ligando distintas. En general, la isoforma IIIb se encuentra en las células epiteliales, mientras que IIIc se expresa en células mesenquimatosas. Al unirse al FGF junto con los proteoglicanos heparán sulfato, los FGFR se dimerizan y se fosforilan en restos de tirosina específicos. Esto facilita el reclutamiento de proteínas adaptadoras cruciales, tales como el sustrato de FGFR 2 α (FRS2 α), que conduce a la activación de múltiples cascadas de señalización, incluidas las rutas de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y PI3K-AKT (1, 3, 4). En consecuencia, los FGF y sus receptores afines regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular, de una manera dependiente del contexto.

Se ha implicado a los FGFR activados de forma anómala en neoplasias malignas humanas específicas (1, 5). En particular, la translocación cromosómica t(4;14) (p16.3;q32) se produce en aproximadamente el 15-20 % de los pacientes con mieloma múltiple, lo que conduce a una sobreexpresión de FGFR3 y se correlaciona con una supervivencia global más corta (6-9). FGFR3 también está implicado en conferir quimiorresistencia a las líneas celulares de mieloma en cultivo (10), en concordancia con la mala respuesta clínica de los pacientes t(4;14)+ a la quimioterapia convencional (8). La sobreexpresión de FGFR3 mutacionalmente activado es suficiente para inducir la transformación oncogénica en células hematopoyéticas y fibroblastos (11-14, 15), modelos de ratones transgénicos (16) y modelos de trasplante de médula ósea murinos (16, 17). Por consiguiente, se ha propuesto a FGFR3 como una posible diana terapéutica potencial en el mieloma múltiple. De hecho, varios inhibidores de molécula pequeña dirigidos a los FGFR, aunque no selectivos para FGFR3 y con actividad inhibidora cruzada hacia otras cinasas, han demostrado citotoxicidad frente a células de mieloma positivas para FGFR3 en cultivo y en modelos de ratón (18-22).

La sobreexpresión de FGFR3 también se ha documentado en una alta fracción de cánceres de vejiga (23, 24). Adicionalmente, se han identificado mutaciones activadoras somáticas en FGFR3 en el 60-70 % de los carcinomas de vejiga papilares y en el 16-20 % de los carcinomas de vejiga con invasión muscular (24, 25). En experimentos de cultivo celular, la interferencia por ARN (11,26) o un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario para FGFR3 inhibía la proliferación de células de cáncer de vejiga (27). Un estudio reciente demostró que un conjugado de anticuerpo y toxina para FGFR3 atenúa el crecimiento del xenoinjerto de una línea celular de cáncer de vejiga a través de del suministro de toxina mediado por FGFR3 en los tumores (28). Sin embargo, no está claro si la señalización del FGFR3 es de hecho un impulsor oncogénico del crecimiento de tumores de vejiga *in vivo*. Además, el potencial terapéutico para el direccionamiento a FGFR3 en el cáncer de vejiga no se ha definido sobre la base de modelos *in vivo*. Las publicaciones relacionadas con FGFR3 y anticuerpos anti-FGFR3 incluyen la publicación de la patente de EE. UU. 2005/0147612; Rauchenberger *et al*, J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003); documento WO2006/048877; Martínez-Torrecedrera *et al*, (2008) Mol Cancer Ther 7(4): 862-873; documento WO2007/144893; Trudel *et al*. (2006) 107(10): 4039-4046; Martínez-Torrecedrera *et al* (2005) Clin Cancer Res 11 (17): 6280-6290; Gomez-Roman *et al* (2005) Clin Cancer Res 11:459-465; Drenzo, R *et al* (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, Resumen N.º 2080; documento WO2010/002862.

Está claro que continúa existiendo la necesidad de agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

Las referencias a los métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de la presente memoria descriptiva deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

65 **Sumario de la invención**

La divulgación se basa en parte en la identificación de diversos agentes de unión a FGFR3 (tales como anticuerpos y

fragmentos de los mismos). FGFR3 presenta una diana terapéutica importante y ventajoso, y la divulgación proporciona composiciones y métodos basados en la unión de los agentes a FGFR3. Los agentes de unión a FGFR3 de la divulgación, como se describe en el presente documento, proporcionan importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para su uso en el direccionamiento a condiciones patológicas asociadas con la expresión y/o la actividad de las rutas de señalización de FGFR3. Por consiguiente, la proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión a FGFR3. La invención se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen a FGFR3. En un aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo aislado que se une a un FGFR3. En algunos aspectos (no reivindicados explícitamente), el anticuerpo se une a una isoforma de FGFR3 IIb y/o una isoforma de FGFR3 IIc. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo se une a un FGFR3 mutado (por ejemplo, uno o más de FGFR3 IIb R248C, S249C, G372C, Y375C, K652E y/o una o más de FGFR3 IIc R248C, S249C, G370C, Y373C, K650E). En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo se une al FGFR3 monomérico (por ejemplo, las isoformas de FGFR3 IIb y/o IIc monomérico). En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo estimula la formación de FGFR3 monomérico, tal como estabilizando la forma monomérica de FGFR3 con respecto a la forma dimerica de FGFR3.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 aislado, en donde una forma de IgG de longitud completa del anticuerpo se une a FGFR3 humano con una Kd de 1×10^{-7} o más fuerte. Como se sabe bien en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor puede determinarse usando cualquiera de diversos ensayos y expresarse en términos de valores cuantitativos. Por consiguiente, la afinidad de unión puede expresarse como valores de Kd y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avidéz minimizados). En general y preferentemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, ya sea en un contexto sin células o asociado a células. Para obtener mediciones de la afinidad de unión puede utilizarse cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), la forma de IgG de longitud completa del anticuerpo se une a FGFR3 humano con una Kd de 1×10^{-8} o más fuerte, con una Kd de 1×10^{-9} o más fuerte, o con una Kd de 1×10^{-10} o más fuerte.

Los anticuerpos anti-FGFR3 de la presente divulgación son anticuerpos antagonistas. Por tanto, en un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben la actividad de FGFR3 (por ejemplo, actividad de FGFR3-IIb y/o FGFR3-IIc). El anticuerpo anti-FGFR3 (generalmente en forma bivalente) no posee una función agonista sustancial de FGFR3. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 (generalmente en forma bivalente) posee poca o ninguna función agonista de FGFR3. El anticuerpo de la divulgación (generalmente en forma bivalente) no presenta un nivel de actividad agonista de FGFR3 que esté por encima del nivel de fondo que tenga significación estadística.

En un aspecto, la unión del anticuerpo a un FGFR3 inhibe la dimerización del receptor con otra unidad del receptor, por lo que se inhibe la activación del receptor (debido, al menos en parte, a la falta de dimerización del receptor). La inhibición puede ser directa o indirecta.

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona anticuerpos anti-FGFR3 que no poseen actividad apoptótica sustancial (por ejemplo, no induce la apoptosis de una célula, por ejemplo, una célula de carcinoma de células de transición o una célula de mieloma múltiple, tal como una célula de mieloma múltiple que comprende una translocación de FGFR3, tal como una translocación t(4;14)). En algunos aspectos (no reivindicados explícitamente), el anticuerpo anti-FGFR3 posee poca o ninguna función apoptótica. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), los anticuerpos para FGFR3 no presentan una función apoptótica que esté por encima del nivel de fondo que tenga significación estadística.

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona anticuerpos anti-FGFR3 que no inducen una regulación a la baja sustancial de FGFR3. El anticuerpo anti-FGFR3 induce poca o ninguna regulación a la baja del receptor. Los anticuerpos para FGFR3 no inducen una regulación a la baja del receptor que esté por encima del nivel de fondo que tenga significación estadística.

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos anti-FGFR3 que poseen función efectora. En una realización, la función efectora comprende la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En un aspecto, el anticuerpo anti-FGFR3 (un anticuerpo anti-FGFR3 desnudo) es capaz de destruir a una célula, en algunos aspectos, células de mieloma múltiple (por ejemplo, células de mieloma múltiple que comprenden una translocación, por ejemplo, una translocación t(4;14)). El anticuerpo anti-FGFR3 es capaz de destruir una célula que expresa aproximadamente 10.000 moléculas de FGFR3 o más por célula (tal como aproximadamente 11.000, aproximadamente 12.000, aproximadamente 13.000, aproximadamente 14.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 16.000, aproximadamente 17.000, aproximadamente 18.000 o más moléculas de FGFR3 por célula). En otros aspectos, la célula expresa aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000 o más moléculas de FGFR3 por célula.

En un aspecto, el anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación inhibe la actividad constitutiva de FGFR3. En algunos

aspectos (no reivindicados de forma explícita), la actividad constitutiva de FGFR3 es actividad constitutiva de FGFR3 dependiente de ligando. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), la actividad de constitutiva FGFR3 es actividad constitutiva de FGFR3 independiente de ligando.

5 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe a FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{R248C}. Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{R248C}" se entiende que abarca a FGFR3-IIIb^{R248C} y FGFR3-IIIc^{R248C}, así como formas adicionales de FGFR3 que comprenden una mutación R a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb R248. Un experto en la materia entiende cómo alinear secuencias de FGFR3 para identificar los restos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3, por ejemplo, alinear una secuencia de FGFR3-IIIc con una secuencia de FGFR3-IIIb para identificar la posición en FGFR3 correspondiente a la posición R248 en FGFR3-IIIb. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe a FGFR3-IIIb^{R248C} y/o FGFR3-IIIc^{R248C}.

15 Los anticuerpos anti-FGFR3 pueden inhibir a FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}. Por conveniencia, la expresión "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}" se entiende que abarca a FGFR3-IIIb^{K652E} y FGFR3-IIIc^{K652E}, así como formas adicionales de FGFR3 que comprenden una mutación K a E en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb K652. Un experto en la materia entiende cómo alinear secuencias de FGFR3 para identificar los restos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3, por ejemplo, alinear una secuencia de FGFR3-IIIc con una secuencia de FGFR3-IIIb para identificar la posición en FGFR3 correspondiente a la posición K652 en FGFR3-IIIb.

El anticuerpo anti-FGFR3 puede inhibir a FGFR3-IIIb^{K652E} y/o FGFR3-IIIc^{K652E}.

25 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}. Por conveniencia, la expresión "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}" se entiende que abarca a FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIc^{S249C}, así como formas adicionales de FGFR3 que comprenden una mutación S a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb S249. El anticuerpo anti-FGFR3 puede inhibir a FGFR3-IIIb^{S249C} y/o FGFR3-IIIc^{S249C}.

30 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}. Por conveniencia, la expresión "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}" se entiende que abarca a FGFR3-IIIb^{G372C} y FGFR3-IIIc^{G372C}, así como formas adicionales de FGFR3 que comprenden una mutación G a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb G372. El anticuerpo anti-FGFR3 puede inhibir a FGFR3-IIIb^{G372C} y/o FGFR3-IIIc^{G372C}.

35 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}. Por conveniencia, la expresión "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}" se entiende que abarca a FGFR3-IIIb^{Y375C} y FGFR3-IIIc^{Y375C}, así como formas adicionales de FGFR3 que comprenden una mutación S a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb S249. El anticuerpo anti-FGFR3 puede inhibir a FGFR3-IIIb^{Y375C} y/o FGFR3-IIIc^{Y375C}.

40 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIb^{K652E} y (b) una o más de FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

45 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIc y (b) una o más de FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{Y375C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{G370C}.

50 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIb^{R248C} y (b) una o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIc^{R248C} y (b) una o más de FGFR3-IIIc^{K652E}, FGFR3-IIIc^{Y375C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{G370C}.

55 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIb^{G372C} y (b) una o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{R248C}.

60 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a (a) FGFR3-IIIc^{G370C} y (b) una o más de FGFR3-IIIc^{K652E}, FGFR3-IIIc^{Y375C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{R248C}.

En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

65 En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben a FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{K652E}, FGFR3-IIIc^{Y375C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 aislado que comprende:

(a) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas de:

- 5 (i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en donde A1-A11 es RASQDVDTSLA (SEQ ID NO:87),
 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en donde B1-B7 es SASFLYS (SEQ ID NO: 88),
 (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en donde C1-C9 es QQSTGHPQT (SEQ ID NO: 89),
 (iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en donde D1-D10 es GTFFTSTTGIS (SEQ ID NO: 84),
 10 (v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en donde E1-E18 es GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEQ ID
 NO:85) y
 (vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F20, en donde F1-F20 es ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID
 NO: 86);

15 Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-18, 48-131 y 140-145 están numeradas con respecto a HVR individuales (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, siendo la numeración concordante con el sistema de numeración de Kabat como se describe a continuación.

El anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 132 y una
 20 región variable de cadena ligera.

El anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 133 y una
 región variable de cadena pesada.

25 El anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 132 y una
 región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 133. Algunos anticuerpos divulgados en el presente
 documento comprenden un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8)
 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE. UU.) (también mencionado en la patente de EE. UU.
 n.º 6.407.213 y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093) como se representa a continuación en el SEQ ID
 NO:173.

30

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val *Asn* Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser *Arg* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln *His* Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:173)

(Los restos de HVR están subrayados)

35 En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), la secuencia del dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-
 8 se modifica en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (*Asn*, *Arg* e *His* como se indica anteriormente en
 negrita/cursiva, respectivamente). En un aspecto particular la secuencia modificada de huMAb4D5-8 comprende Ser
 en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. Por consiguiente, en un aspecto (no reivindicado de
 40 forma explícita), un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia
 representada a continuación en el SEQ ID NO: 174:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:174)

(Los restos de HVR están subrayados)

- 5 Los restos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrita/cursiva.

Los anticuerpos pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de armazón adecuada, siempre que la actividad de unión a FGFR3 se conserve sustancialmente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender una secuencia consenso de armazón de cadena pesada del subgrupo III humano. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), la secuencia consenso de armazón comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En un ejemplo, estos anticuerpos comprenden secuencias de armazón de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE. UU.) (también mencionado en las patentes de EE. UU. n.º 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093). En un ejemplo, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de armazón de cadena ligera kappa I humana. En un ejemplo particular, estos anticuerpos comprenden secuencias de HVR de cadena ligera de huMAb4D5-8 como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 6.407.213 y 5.821.337.) En un ejemplo, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE. UU.) (también mencionado en las patentes de EE. UU. n.º 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093).

20 Un anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada, en donde la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son el SEQ ID NO: 13, 14 y/o 15, respectivamente. En otro ejemplo, la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son el SEQ ID NO: 48, 49 y/o 50, respectivamente. En otro ejemplo más, la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son el SEQ ID NO: 84, 85 y/o 86, respectivamente. En un ejemplo adicional, la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son el SEQ ID NO: 108, 109 y/o 110, respectivamente.

40 En un ejemplo particular, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia marco conservada comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268 y/o 41 y 269-271 y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEQ ID NO: 16, 17 y/o 18, respectivamente. En otro ejemplo, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEQ ID NO: 51, 52 y/o 53, respectivamente. En un ejemplo adicional, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEQ ID NO: 87, 88 y/o 89, respectivamente. En otro ejemplo más, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en donde la secuencia de armazón comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEQ ID NO: 111, 112, y/o 113, respectivamente.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia del SEQ ID NO: 132 y/o un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia del SEQ ID

NO: 133.

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 que se une a un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos: LAVPAANTVRRFCPA (SEQ ID NO:179) y/o SDVEFHCKVYSDAQP (SEQ ID NO:180).

En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo se une a un polipéptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los aminoácidos número 164-178 y/o 269-283 de la secuencia de aminoácidos de la FGFR3 humana madura.

En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación se une específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % de identidad o similitud de secuencia con la secuencia LAVPAANTVRRFCPA (SEQ ID NO: 179) y/o SDVEFHCKVYSDAQP (SEQ ID NO: 180).

En un aspecto, (no reivindicado de forma explícita) el anticuerpo anti-FGFR3 de la presente divulgación se une a al menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los restos 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 y/o 318 del polipéptido FGFR3 IIIb, o restos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc. Un experto en la materia entiende cómo alinear secuencias de FGFR3 para identificar los restos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3. Las combinaciones de dos o más restos pueden incluir cualquiera de los restos 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 y/o 318 del polipéptido FGFR3 IIIb, o restos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-FGFR3 incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los restos 158, 159, 169, 170, 171, 173, 175, 205, 207, y/o 315 del polipéptido FGFR3 IIIb, o restos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-FGFR3 incluye al menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los restos 158, 170, 171, 173, 175 y/o 315 del polipéptido FGFR3 IIIb, o restos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc.

Como se conoce en la técnica, y como se describe con más detalles a continuación, la posición/límite de aminoácidos que delimita una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, la posición/límite de aminoácidos que delimita una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden considerarse posiciones hipervariables híbridas en tanto que estas posiciones pueden considerarse dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios, mientras que se consideran fuera de una región hipervariable según un conjunto de criterios distinto. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en regiones hipervariables extendidas (como se define a continuación).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con afinidad madurada, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv.

En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo para FGFR3 es un anticuerpo de un solo brazo (es decir, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera forman un solo brazo de unión a antígeno) que comprende una región Fc, en donde la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido Fc, en donde los polipéptidos Fc primero y segundo están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, documento WO2006/015371.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión a antígeno de un donante no humano injertado en una secuencia no humana heteróloga, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias de armazón y/o de dominio constante). En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), el donante no humano es un ratón. En un aspecto adicional (no reivindicado de forma explícita), una secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida por mutagénesis (por ejemplo, cribado por presentación en fagos, etc.). En un aspecto particular (no reivindicado de forma explícita), un anticuerpo quimérico de la divulgación tiene regiones V murinas y una región C humana. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), la región V de cadena ligera murina se fusiona con una cadena ligera kappa humana. En otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), la región V de cadena pesada murina se fusiona con una región C de IgG1 humana.

Los anticuerpos humanizados de la divulgación incluyen los que tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco conservada (FR) y variantes con maduración de la afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en la CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo donante o receptor. Los anticuerpos pueden comprender además cambios en los restos de aminoácidos en la región Fc que conducen a una

función efectora mejorada que incluye una función de CDC y/o ADCC potenciada y a la destrucción de linfocitos B. Otros anticuerpos de la divulgación incluyen los que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. Los anticuerpos pueden comprender cambios en los restos de aminoácidos en la región Fc que conducen a una función efectora disminuida, por ejemplo, una función de CDC y/o ADCC disminuida y/o destrucción de linfocitos B disminuida.

5 Los anticuerpos se pueden caracterizar por una unión disminuida (tal como la ausencia de unión) al factor C1q del complemento humano y/o al receptor de Fc humano en linfocitos citolíticos naturales (NK). Los anticuerpos pueden caracterizarse por una unión disminuida (tal como la ausencia de unión) a los FcγRI, FcγRIIA y/o FcγRIIA humanos. Los anticuerpos pueden ser de la clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprender al menos una mutación en E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice

10 de EU). Los anticuerpos pueden comprender las mutaciones L234A/L235A o D265A/N297A.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a la misma. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento

15 US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a

20 anticuerpos con carbohidratos modificados unidos a la región Fc de los mismos. Véase, también, el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada. En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos de unión a FGFR3 que comprenden cualquiera de las secuencias de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento, en donde los polipéptidos de unión a FGFR3 se unen específicamente a un FGFR3, por ejemplo, un FGFR3 humano y/o de macaco cangrejero y/o de ratón.

25 Los anticuerpos de la divulgación se unen (tal como unirse específicamente) a FGFR3 (por ejemplo, FGFR3-IIIb y/o FGFR3-IIIc) y, en algunos aspectos, pueden modular (por ejemplo, inhibir) uno o más aspectos de la señalización de FGFR3 (tal como la fosforilación de FGFR3) y/o la alteración de cualquier ruta biológica de FGFR3 y/o el ligando de FGFR3 biológicamente relevante, y/o el tratamiento y/o la prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un

30 cáncer; y/o el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR3 (tal como una expresión y/o actividad aumentadas de FGFR3). En algunos aspectos, el anticuerpo para FGFR3 se une específicamente a un polipéptido que consiste o consiste esencialmente en un FGFR3 (por ejemplo, un FGFR3 humano o de ratón). En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo se une específicamente a FGFR3 con una Kd de 1×10^{-7} M o más fuerte.

35 El anticuerpo anti-FGFR3 de la invención no es un anticuerpo anti-FGFR3 descrito en la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0147612 (por ejemplo, anticuerpo MSPRO2, MSPRO12, MSPRO59, MSPRO11, MSPRO21, MSPRO24, MSPRO26, MSPRO28, MSPRO29, MSPRO43, MSPRO55), el anticuerpo descrito en Rauchenberger *et al.*, J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003); un anticuerpo descrito en la Publicación PCT n.º WO2006/048877 (por

40 ejemplo, anticuerpo PRO-001), un anticuerpo descrito en Martínez-Torrecuadrada *et al.*, Mol Cancer Ther (2008) 7(4): 862-873 (por ejemplo, scFvFGFR3 3C), un anticuerpo descrito en Direnzo, R *et al.* (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, resumen n.º 2080 (por ejemplo, D11) o un anticuerpo descrito en el documento WO 2010/002862 (por ejemplo, los anticuerpos 15D8, 27H2, 4E7, 2G4, 20B4).

45 La divulgación proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la divulgación y un transportador. En un aspecto, el transportador es farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, (no reivindicado de forma explícita) la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo para FGFR3 de la divulgación.

50 En otro aspecto más, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la divulgación

En un aspecto adicional, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la divulgación y un transportador. En un aspecto (no reivindicado de forma

55 explícita), el transportador es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico o un vector de la divulgación. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de diversas células hospedadoras. En un

60 aspecto (no reivindicado de forma explícita), una célula hospedadora es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), una célula hospedadora es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

65 En un aspecto adicional, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona métodos de fabricación de un anticuerpo de la divulgación. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos de fabricación de un anticuerpo anti-

FGFR3 (que, como se define en el presente documento, incluye el anticuerpo de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método expresar en una célula hospedadora adecuada un vector recombinante de la divulgación que codifica el anticuerpo, y recuperar el anticuerpo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo para que se exprese el ácido nucleico. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el método comprende además recuperar el anticuerpo a partir de la célula de cultivo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo se recupera del medio de cultivo de la célula hospedadora. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el método comprende además combinar el anticuerpo recuperado con un transportador, excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable para preparar una formulación farmacéutica que comprenda el anticuerpo humanizado.

En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), la descripción proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en donde la composición comprende uno o más anticuerpos FGFR3 de la divulgación. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), la composición comprende un ácido nucleico de la divulgación. En otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), una composición que comprende un anticuerpo comprende además un transportador, que en algunos aspectos es farmacéuticamente aceptable. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), un artículo de fabricación de la divulgación comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo (tales como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento).

También se describe en el presente documento un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-FGFR3 de la divulgación y un segundo recipiente que comprende un tampón. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), el tampón es farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un transportador, que en algunos aspectos es farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para uso como medicamento.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunos aspectos, sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado.

En un aspecto adicional (no reivindicado de forma explícita), la divulgación proporciona un anticuerpo anti FGFR3 de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno tal como un trastorno óseo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el trastorno es la acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación para su uso en la reducción de la proliferación celular.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para su uso en la destrucción de una célula. En algún aspecto (no reivindicado de forma explícita), la célula es una célula de mieloma múltiple. En algunos aspectos, la célula es destruida mediante ADCC. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), la célula sobreexpresa FGFR3.

En un aspecto adicional (no reivindicado de forma explícita), la divulgación proporciona un anticuerpo anti-FGFR3 de los aspectos de la divulgación de la divulgación para su uso en empobrecer células, tales como células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula es destruida mediante ADCC. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos aspectos (no reivindicados de manera explícita), la célula sobreexpresa FGFR3.

En el presente documento se describe el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunos aspectos, sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento se describe el uso de un ácido nucleico de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunos aspectos, sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es

un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento se describe el uso de un vector de expresión de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunas realizaciones, sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento se describe el uso de una célula hospedadora de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunas realizaciones, sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento se describe el uso de un artículo de fabricación de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunos aspectos sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento se divulga el uso de un kit de la divulgación en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un proceso patológico asociado con la activación y/o expresión de FGFR3 (en algunos aspectos, sobreexpresión). En algunos casos, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular. En algunos casos, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular es mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), cáncer de mama o cáncer de hígado. En algunos casos, el trastorno es un trastorno óseo, por ejemplo, acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación en la preparación de un medicamento para la inhibición de la proliferación celular. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación en la preparación de un medicamento para destruir células. En algunos casos, la célula es una célula de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula es destruida mediante ADCC. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos casos, la célula sobreexpresa FGFR3.

En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la divulgación en la preparación de un medicamento para el empobrecimiento de células, tales como células de mieloma múltiple. En algunos casos, la célula es destruida mediante ADCC. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos casos, la célula sobreexpresa FGFR3.

La divulgación proporciona métodos y composiciones útiles para modular trastornos asociados con la expresión y/o señalización de FGFR3, tales como la expresión y/o señalización aumentadas o la expresión y/o señalización no deseadas.

Los usos médicos de la invención se pueden utilizar para afectar cualquier patología adecuada. Los trastornos ilustrativos se describen en el presente documento e incluyen un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral (por ejemplo, neuroblastoma o meningioma), cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma basocelular o carcinoma de células escamosas), cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición), carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CCR), carcinoma hepatocelular, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y neoplasias malignas hemáticas (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B), leucemia mielógena aguda (LMA), neoplasias malignas de linfocitos B, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple). En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el trastorno es carcinoma invasivo de células de transición. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el trastorno es mieloma múltiple. Los trastornos ilustrativos adicionales incluyen trastornos óseos, tales como acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

- En determinados aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3, FGFR3 amplificado, FGFR3 translocado y/o FGFR3 mutado. En determinados aspectos, el cáncer expresa FGFR3 activado. En determinados aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 translocado (por ejemplo, una translocación t(4;14)). En determinados aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 constitutivo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita) el FGFR3 constitutivo comprende una mutación en el dominio tirosina cinasa y/o el dominio yuxtamembrana y/o un dominio de unión a ligando. En determinados aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 independiente de ligando. En algunos, el cáncer expresa FGFR3 dependiente de ligando.
- 10 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresaba FGFR3-IIIb^{S248C} y/o FGFR3-IIIc^{S248C}.
- 15 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresaba FGFR3-IIIb^{K652E} y/o FGFR3-IIIc^{K650E}.
- 20 FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{S249C} y/o FGFR3-IIIc^{S249C}.
- En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{G372C} y/o FGFR3-IIIc^{G370C}.
- 25 En un aspecto, el cáncer (no reivindicado de forma explícita) expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{Y375C} y/o FGFR3-IIIc^{Y373C}.
- 30 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{K652E} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.
- En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{R248C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.
- 35 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{G372C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{R248C}.
- 40 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.
- En determinados aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa niveles aumentados de fosfo-FGFR3, fosfo-FRS2 y/o fosfo-MAPK con respecto a una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido normal) o nivel de control.
- 45 En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa (por ejemplo, en la superficie celular) aproximadamente 10.000 moléculas de FGFR3 por célula o más (tal como 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000 o más receptores de FGFR3). En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa aproximadamente 13.000 moléculas de FGFR3. En otros aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa aproximadamente 5000, 6000, 7000, 8000 o más moléculas de FGFR3. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa menos de aproximadamente 4000, 3000, 2000, 1000 o menos moléculas de FGFR3. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el cáncer expresa menos de aproximadamente 1000 moléculas de FGFR3. En un aspecto, una célula a la que se dirige un uso médico de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón (por ejemplo, una célula de cáncer de pulmón no microcítico), una célula de cáncer de tiroides, una célula de mieloma múltiple, una célula de cáncer testicular, una célula de carcinoma papilar, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga (por ejemplo, una célula de carcinoma de células de transición), una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de leucemia, una célula de mieloma múltiple (por ejemplo, una célula de mieloma múltiple que comprende una translocación t(4;14) FGFR3) y una célula de adenoma de colon. En un aspecto (no reivindicado de forma explícita), una célula a la que se dirige un uso médico de la divulgación es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), una célula a la que se dirige un uso médico de la divulgación es una célula displásica. En aún otro aspecto (no reivindicado de forma explícita), una célula a la que se dirige un uso médico de la divulgación es una célula metastásica.
- 65

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona métodos para inhibir la proliferación celular en un sujeto de la divulgación, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGFR3 para reducir la proliferación celular.

5 En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona métodos para destruir una célula en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGFR3 para destruir una célula. En algunos aspectos la célula es una célula de mieloma múltiple. La célula puede ser destruida mediante ADCC. En algún aspecto (no reivindicado de forma explícita), el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos
10 aspectos (no reivindicados de forma explícita), la célula sobreexpresa FGFR3.

En un aspecto, la divulgación (no reivindicada de forma explícita) proporciona métodos para empobrecer células (tal como células de mieloma múltiple) en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGFR3 para destruir una célula. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), la
15 célula es destruida mediante ADCC. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), la célula sobreexpresa FGFR3.

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar o prevenir un trastorno óseo. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el trastorno es la acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (DT; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

Los usos médicos de la invención comprenden además etapas de tratamiento adicionales en el método. El uso médico implica un método que comprende una etapa en donde una célula y/o tejido que se tiene como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a un tratamiento de radiación o a un agente quimioterapéutico. Los usos médicos se refieren al tratamiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FGFR3 en
25 combinación con un agente citotóxico. En ejemplos particulares, los anticuerpos anti-FGFR3 se usan en combinación con velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecán, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, bevacizumab, vincristina, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, 5-fluorouracilo, doxorubicina, bortezomib, lenalidomida, dexametasona, mefalina, prednisona, vincristina
30 y/o talidomida.

Dependiendo de la indicación específica del cáncer a tratar, la terapia de combinación de la divulgación se puede combinar con agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos, o terapias adicionales tales como radioterapia o cirugía. En la terapia de combinación de la invención pueden usarse muchos agentes quimioterapéuticos conocidos. Preferentemente, se utilizarán los agentes quimioterapéuticos que sean convencionales para el tratamiento de las indicaciones específicas. La dosificación o frecuencia de cada agente terapéutico a utilizar en la combinación es preferentemente igual o inferior a la dosificación o frecuencia del agente correspondiente cuando se usa sin el otro (u otros) agente.

40 También se describen en el presente documento anticuerpos anti-FGFR3 en donde el anticuerpo anti-FGFR3 comprende un marcador detectable.

También se describen en el presente documento complejos de cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR3 descritos en el presente documento y FGFR3. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el complejo es *in vivo* o
45 *in vitro*. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el complejo comprende una célula cancerosa. En algunos aspectos (no reivindicados de forma explícita), el anticuerpo anti-FGFR3 está marcado de forma detectable.

Breve descripción de los dibujos

50 FIGURAS 1A, 1B y 1C: Secuencias de bucles de HVR de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-FGFR3. Las figuras muestran las secuencias de HVR de la cadena pesada, H1, H2 y H3, y secuencias de HVR de cadena ligera, L1, L2 y L3. La numeración de las secuencias es la siguiente:

Clon 184.6 (HVR-H1 es el SEQ ID NO: 1; HVR-H2 es el SEQ ID NO:2; HVR-H3 es el SEQ ID NO:3; HVR-L1 es el SEQ ID NO:4; HVR-L2 es el SEQ ID NO:5; HVR-L3 es el SEQ ID NO:6);
55 Clon 184.6.1 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:7; HVR-H2 es el SEQ ID NO:8; HVR-H3 es el SEQ ID NO:9; HVR-L1 es el SEQ ID NO:10; HVR-L2 es el SEQ ID NO:11; HVR-L3 es el SEQ ID NO:12)
Clon 184.6.58 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:13; HVR-H2 es el SEQ ID NO:14; HVR-H3 es el SEQ ID NO:15; HVR-L1 es el SEQ ID NO:16; HVR-L2 es el SEQ ID NO:17; HVR-L3 es el SEQ ID NO:18)
60 Clon 184.6.62 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:48; HVR-H2 es el SEQ ID NO:49; HVR-H3 es el SEQ ID NO:50; HVR-L1 es el SEQ ID NO:51; HVR-L2 es el SEQ ID NO:52; HVR-L3 es el SEQ ID NO:53)
Clon 184.6.21 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:54; HVR-H2 es el SEQ ID NO:55; HVR-H3 es el SEQ ID NO:56; HVR-L1 es el SEQ ID NO:57; HVR-L2 es el SEQ ID NO:58; HVR-L3 es el SEQ ID NO:59)
Clon 184.6.49 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:60; HVR-H2 es el SEQ ID NO:61; HVR-H3 es el SEQ ID NO:62; HVR-L1 es el SEQ ID NO:63; HVR-L2 es el SEQ ID NO:64; HVR-L3 es el SEQ ID NO:65)
65 Clon 184.6.51 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:66; HVR-H2 es el SEQ ID NO:67; HVR-H3 es el SEQ ID NO:68;

HVR-L1 es el SEQ ID NO:69; HVR-L2 es el SEQ ID NO:70; HVR-L3 es el SEQ ID NO:71)
 Clon 184.6.52 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:72; HVR-H2 es el SEQ ID NO:73; HVR-H3 es el SEQ ID NO:74;
 HVR-L1 es el SEQ ID NO:75; HVR-L2 es el SEQ ID NO:76; HVR-L3 es el SEQ ID NO:77)
 Clon 184.6.92 (HVR-H1 es el SEQ ID NO:78; HVR-H2 es el SEQ ID NO:79; HVR-H3 es el SEQ ID NO:80;
 HVR-L1 es el SEQ ID NO:81; HVR-L2 es el SEQ ID NO:82; HVR-L3 es el SEQ ID NO:83)
 Clon 184.6.1.N54S (HVR-H1 es el SEQ ID NO:84; HVR-H2 es el SEQ ID NO:85; HVR-H3 es el SEQ ID NO:86;
 HVR-L1 es el SEQ ID NO:87; HVR-L2 es el SEQ ID NO:88; HVR-L3 es el SEQ ID NO:89)
 Clon 184.6.1.N54G (HVR-H1 es el SEQ ID NO:90; HVR-H2 es el SEQ ID NO:91; HVR-H3 es el SEQ ID NO:92;
 HVR-L1 es el SEQ ID NO:93; HVR-L2 es el SEQ ID NO:94; HVR-L3 es el SEQ ID NO:95)
 Clon 184.6.1.N54A (HVR-H1 es el SEQ ID NO:96; HVR-H2 es el SEQ ID NO:97; HVR-H3 es el SEQ ID NO:98;
 HVR-L1 es el SEQ ID NO:99; HVR-L2 es el SEQ ID NO:100; HVR-L3 es el SEQ ID NO:101)
 Clon 184.6.1.N54Q (HVR-H1 es el SEQ ID NO:102; HVR-H2 es el SEQ ID NO:103; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:104; HVR-L1 es el SEQ ID NO:105; HVR-L2 es el SEQ ID NO:106; HVR-L3 es el SEQ ID NO:107)
 Clon 184.6.58.N54S (HVR-H1 es el SEQ ID NO:108; HVR-H2 es el SEQ ID NO:109; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:110; HVR-L1 es el SEQ ID NO:111; HVR-L2 es el SEQ ID NO:112; HVR-L3 es el SEQ ID NO:113)
 Clon 184.6.58.N54G (HVR-H1 es el SEQ ID NO:114; HVR-H2 es el SEQ ID NO:115; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:116; HVR-L1 es el SEQ ID NO:117; HVR-L2 es el SEQ ID NO:118; HVR-L3 es el SEQ ID NO:119)
 Clon 184.6.58.N54A (HVR-H1 es el SEQ ID NO:120; HVR-H2 es el SEQ ID NO:121; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:122; HVR-L1 es el SEQ ID NO:123; HVR-L2 es el SEQ ID NO:124; HVR-L3 es el SEQ ID NO:125)
 Clon 184.6.58.N54Q (HVR-H1 es el SEQ ID NO:126; HVR-H2 es el SEQ ID NO:127; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:128; HVR-L1 es el SEQ ID NO:129; HVR-L2 es el SEQ ID NO:130; HVR-L3 es el SEQ ID NO:131).
 Clon 184.6.1.NS D30E (HVR-H1 es el SEQ ID NO:143; HVR-H2 es el SEQ ID NO:144; HVR-H3 es el SEQ ID
 NO:145; HVR-L1 es el SEQ ID NO:140; HVR-L2 es el SEQ ID NO:141; HVR-L3 es el SEQ ID NO:142).
 Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se
 describe a continuación.

FIGURA 2A y 2B: representan (A) las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y
 las regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos anti-FGFR3 184.6.1.N54S, 184.6.58 y 184.6.62; y (B)
 las regiones hipervariables de los anticuerpos anti-FGFR3 1G6, 6G1 y 15B2.

FIGURAS 3A, 3B y 4: representan secuencias de armazón consenso humanas aceptadoras ilustrativas para su
 uso en la práctica de la presente divulgación con identificadores de secuencia de la siguiente manera:

Armazones consenso de variable pesado (VH) (FIG. 3A, 3B)

armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos las CDR de Kabat (las SEQ ID NO: 19 y 203-205)
 armazón consenso del subgrupo I de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (las SEQ
 ID NO: 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214)
 armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos las CDR de Kabat (las SEQ ID NO: 23 y 215-217)
 armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (las SEQ
 ID NO: 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226)
 armazón consenso del subgrupo II de VH humano menos extendidas
 armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos las CDR de Kabat (las SEQ ID NO: 27 y 227-
 229)
 armazón consenso del subgrupo III de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (las SEQ
 ID NO: 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238)
 armazón aceptador de VH humano menos las CDR de Kabat (las SEQ ID NO: 31 y 239-241)
 armazón aceptador de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (las SEQ ID NO: 32 y
 242-244, 33 y 245-247)
 armazón aceptador 2 de VH humano menos las CDR de Kabat (las SEQ ID NO: 34 y 248-250), armazón
 aceptador 2 de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (las SEQ ID NO: 35 y 251-253,
 36 y 254-256, 37 y 257-259)

Armazones consenso de ligera variable (VL) (FIG. 4)

armazón consenso del subgrupo I de VL kappa humana (SEQ ID NO: 38 y 260-262)
 armazón consenso del subgrupo II de VL kappa humana (SEQ ID NO: 39 y 263-265)
 armazón consenso del subgrupo III de VL kappa humana (SEQ ID NO: 40 y 266-268)
 armazón consenso del subgrupo IV de VL kappa humana (SEQ ID NO: 41 y 269-271)

FIGURA 5: representa secuencias de la región marco conservada de las cadenas ligera (SEQ ID NOS: 42-45) y
 pesada (SEQ ID NOS: 46, 47, 175, 176) de huMab4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones
 de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 6: representa secuencias de regiones marco conservadas modificadas/variantes de las cadenas ligera
 (las SEQ ID NO: 42, 43, 177, 45) y pesada (las SEQ ID NO: 46, 47, 178 y 176) de huMab4D5-8. Los números en
 superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 7: La atenuación génica de FGFR3 en la célula de cáncer de vejiga RT112 inhibe la proliferación e induce

la detención del ciclo celular en G1 *in vitro* y suprime el crecimiento tumoral *in vivo*. Se clonaron tres ARNhc de FGFR3 distintos en un vector de expresión inducible por Tet. Se establecieron con selección de puomicina células RT112 que expresan de manera estable los ARNhc de FGFR3 o un ARNhc de control. (A) Transferencias representativas que muestran la expresión de FGFR3 en clones seleccionados tratados con o sin doxiciclina (Dox, 0, 0,1 y 1 µg/ml, de izquierda a derecha). (B) Incorporación de [³H]-timidina por células estables RT112. Los clones estables de RT112 se cultivaron con o sin doxiciclina 1 µg/ml durante 3 días antes de la incubación de 16 horas con [³H]-timidina (1 µCi por pocillo). Los recuentos de [³H]-timidina incorporada se normalizaron con respecto a los de las células sin inducción con doxiciclina. Las barras de error representan el ETM. (C) Histogramas de citometría de flujo de fluorescencia de ADN de células estables RT112. Los clones de RT112 que expresaban ARNhc de control o ARNhc4 de FGFR3 se cultivaron con o sin doxiciclina 1 µg/ml durante 72 horas, y los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (IP). Se obtuvieron resultados similares para ARNhc2 y 6 de FGFR3 (Figura 16). (D) El crecimiento de células RT112 que expresan el ARNhc de control (n = 9 por grupo de tratamiento) o ARNhc4 de FGFR3 (n = 11 por grupo de tratamiento) en ratones. A los ratones se les proporcionó sacarosa al 5 % sola o se complementó con 1 mg/ml de doxiciclina, y se midió el tamaño tumoral dos veces por semana. Las barras de error representan el ETM. Se obtuvieron resultados similares para ARNhc2 y 6 de FGFR3 (Figura 16). Cuadro inferior: Expresión de la proteína FGFR3 en lisados tumorales extraídos de tejidos de xenoinjerto de células estables para ARNhc de control o ARNhc4 de FGFR3.

FIGURA 8: R3Mab bloquea la interacción FGF/FGFR3. (A) Unión selectiva de FGFR3 humano por R3Mab. Se inmovilizaron proteínas quiméricas FGFR1-4 humano Fc y se incubaron con una cantidad creciente de R3Mab. La unión específica se detectó utilizando un anticuerpo anti-Fab humano. (B-C) Bloqueo de la unión de FGF1 a FGFR3-IIIb (B) o IIIc (C) humano por R3Mab. La unión específica se detectó mediante el uso de un anticuerpo policlonal específico para FGF1 biotinilado. (D-E) Bloqueo de la unión de FGF9 a FGFR3-IIIb (D) o IIIc (E) humanos por R3Mab. La unión específica se detectó mediante el uso de un anticuerpo policlonal específico para FGF9 biotinilado. Las barras de error representan el error típico de la media (ETM) y, a veces, son más pequeñas que los símbolos.

FIGURA 9: R3Mab inhibe la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3 de tipo silvestre y mutado. (A) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la viabilidad de las células Ba/F3 que expresan FGFR3-IIIb humano de tipo silvestre. Las células se cultivaron en medio sin FGF1 (ausencia de FGF1), o en presencia de FGF1 10 ng/ml más heparina sola 10 µg/ml (FGF1), o en combinación con un anticuerpo de control (Control) o R3Mab. La viabilidad celular se evaluó con CellTiter-Glo (Promega) después de 72 horas de incubación con los anticuerpos. (B) Inhibición de la fosforilación de FGFR3 y MAPK por R3Mab en células estables para Ba/F3-FGFR3-IIIb^{TS}. Las células se trataron con FGF1 15 ng/ml y heparina 10 µg/ml (+) o solo heparina (-) durante 10 minutos, después de la preincubación con un Ac de control (Ctrl), cantidad decreciente de R3Mab (1, 0,2, 0,04 µg/ml respectivamente) en PBS, o solo PBS (simulado) durante 3 horas. Los lisados se inmunotransfirieron para evaluar la fosforilación de FGFR3 y p44/42 MAPK con anticuerpos para pFGFR^{Y653/654} y pMAPK^{Thr202/Tyr204} respectivamente. (C) Representación esquemática de los puntos calientes de mutación de FGFR3 y la frecuencia en el cáncer de vejiga (la numeración de la secuencia representada se basa en la secuencia de aminoácidos de la isoforma FGFR3 IIIb) basándose en los datos publicados (32). TM, dominio transmembrana; TK1 y TK2, dominio tirosina cinasa 1 y 2. (D-H) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la viabilidad de las células Ba/F3 que expresan mutantes de FGFR3 asociados con cáncer. G372C se obtiene de la isoforma IIIc y el resto se obtiene de la isoforma IIIb. La numeración de las secuencias para todos los mutantes se basa en la secuencia de aminoácidos de la isoforma FGFR3 IIIb (incluido el mutante G372C, que se numeraría como G370C en función de la secuencia de aminoácidos de la isoforma FGFR3 IIIc). La viabilidad celular se evaluó después de 72 horas de incubación con anticuerpos como se describe en (A). Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 10: Mapeo epitópico para R3Mab y estructura cristalina del complejo entre el fragmento Fab de R3Mab e IgD2-D3 de FGFR3-IIIb humano. (A) Epítipo determinado por la unión de 13 péptidos que abarcan IgD2-D3 de FGFR3 humano a R3Mab. Cada péptido biotinilado se capturó en pocillos de microtitulación recubiertos con estreptavidina y se incubó con R3Mab. El R3Mab unido específicamente se detectó utilizando un anticuerpo anti-IgG humana de cabra. (B) Alineamiento de secuencias de los péptidos de FGFR3 humano 3 (LAVPAANTVRFRCPA (SEQ ID NO:179) y 11 (SDVEFHCKVYSDAQ (SEQ ID NO:180) con segmentos extracelulares de FGFR1 humano (péptido 3: HAVPAAKTVKFKCPS (SEQ ID NO: 181); péptido 11: SNVEFMCKVYSDPQP (SEQ ID NO: 182)). Los restos de FGFR1 implicados en la interacción primaria FGF2-FGFR1, la unión a heparina y la asociación receptor-receptor se muestran en negrita, cursiva y con subrayado, respectivamente. La asignación funcional de los restos de FGFR1 se basa en Plotnikov *et al.* (34). (C) Estructura del Fab de R3Mab (mostrada como cinta-hélice, cadena ligera gris, cadena pesada negra) formando un complejo con IgD2-D3 de FGFR3 humano (mostrado en la superficie molecular, blanco). Los restos del receptor implicados en la unión y dimerización del ligando están coloreados en gris/rayado y gris oscuro, respectivamente, basándose en Plotnikov *et al.* (34). (D) El detalle de la estructura cristalina muestra que CDR-H3 y -H2 del Fab constituyen los principales sitios de interacción con IgD2 e IgD3 de FGFR3. (E) Superposición del complejo FGFR3-IIIc-FGF1 (código de PDB 1RY7) con el complejo FGFR3-IIIb-Fab. FGFR3-IIIc y FGF1 están coloreados respectivamente en gris y gris oscuro. FGFR3-IIIb se muestra en blanco y el Fab se muestra en gris claro para la cadena ligera, gris oscuro para cadena pesada. Se usó IgD2 como base para la superposición. Obsérvese la IgD2 bien superpuesta de ambas estructuras y la nueva conformación adoptada por IgD3 de FGFR3-IIIb cuando se une a R3Mab. (F) Otra representación de la superposición del complejo FGFR3-IIIc-FGF1 (código de PDB 1RY7) con el complejo FGFR3-IIIb-Fab. FGFR3-IIIc y FGF1 se muestran como superficies moleculares de textura gris/malla y gris oscuro/textura punteada, respectivamente. FGFR3-IIIb se muestra en blanco y el Fab se muestra en gris para la

cadena ligera, negro para cadena pesada. Se usó IgD2 como base para la superposición. Obsérvese la IgD2 bien superpuesta de ambas estructuras y la nueva conformación adoptada por IgD3 de FGFR3-IIIb cuando se une a R3Mab.

FIGURA 11: R3Mab inhibe la proliferación, el crecimiento clonal y señalización de FGFR3 en células de cáncer de vejiga que expresan FGFR3 de tipo silvestre o FGFR3^{S249C} mutado. (A) Inhibición de la incorporación de [³H]-timidina mediante R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RT112. Las barras de error representan el ETM. (B) Bloqueo de la señalización de FGFR3 activada por FGF1 por R3Mab (15 µg/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga RT112 en comparación con el medio de tratamiento solo (simulado) o un anticuerpo de control (Ctrl). Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-FGFR3 y se evaluó la fosforilación de FGFR3 con un anticuerpo anti-fosfo-tirosina (4G10). Los lisados se inmunotransfirieron para detectar la fosforilación de AKT (pAKT^{S473}) y p44/42 MAPK (pMAPK^{Thr202/Tyr204}). (C) Inhibición del crecimiento clonal por R3Mab (10 µg/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga UMUC-14 (que porta FGFR3^{S249C}) en comparación con el solo medio de tratamiento (simulado) o un anticuerpo de control (Ctrl). (D) Cuantificación del estudio en (C) que informa el número de colonias de más de 120 µm de diámetro por pocillo de una réplica de 12 pocillos. Las barras de error representan el ETM. $P < 3,4 \times 10^{-9}$ frente a simulado o Ctrl. (E) Inhibición de la fosforilación de FGFR3 en células UMUC-14 por R3Mab (15 µg/ml). La fosforilación de FGFR3 se analizó como en (B). Obsérvese la fosforilación constitutiva de FGFR3 en esta línea celular.

FIGURA 12: R3Mab disminuye el nivel en el equilibrio del dímero de FGFR3^{S249C} unido a disulfuro al dirigir el equilibrio dímero-monómero hacia el estado monomérico. (A) Efecto de R3Mab sobre el dímero de FGFR3^{S249C} en células UMUC-14. Las células se incubaron con R3Mab (15 µg/ml) o un anticuerpo de control (Ctrl) durante 3 horas, y los lisados de células completas se analizaron mediante inmunotransferencia en condiciones no reductoras y reductoras. (B) Efecto del bloqueante de sulfhidrilos libres DTNB sobre el equilibrio dímero-monómero de FGFR3^{S249C} en células UMUC-14. Las células UMUC-14 se trataron con una concentración creciente de DTNB durante 3 horas y los lisados celulares se analizaron como en (A). (C) Efecto de R3Mab sobre dímero de FGFR3^{S249C} recombinante purificado *in vitro*. El dímero de FGFR3^{S249C} compuesto de IgD2-D3 se purificó a través de una columna de exclusión por tamaño y se incubó con PBS (simulado), un anticuerpo de control (Ctrl) o R3Mab, a 37 °C. Las muestras se recogieron en el tiempo indicado para el análisis por inmunotransferencia en condiciones no reductoras. El dímero-monómero de FGFR3 se detectó utilizando el anticuerpo de hibridoma anti-FGFR3 6G1 (A-C).

FIGURA 13: R3Mab inhibe el crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de vejiga y el crecimiento de aloinjertos de Ba/F3-FGFR3^{S249C}. (A) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga de RT112 preestablecidos en comparación con el control de vehículo. n=10 por grupo. (B) Inhibición de la señalización de FGFR3 en tejidos tumorales de RT112 por R3Mab. En un experimento distinto, Se recogieron tumores de xenoinjerto de RT112 que se trataron con 15 mg/kg de un anticuerpo de control (Ctrl) o R3Mab durante 48 horas o 72 horas (n = 3 por grupo), se homogeneizaron y se analizaron en cuanto a la activación de FRS2α y MAPK mediante inmunotransferencia. (C) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de aloinjertos de Ba/F3-FGFR3^{S249C} preestablecidos. n=10 por grupo. (D) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de vejiga de UMUC-14 preestablecidos, n = 10 por grupo. (E) Efecto de R3Mab sobre el dímero de FGFR3^{S249C} y la señalización en tejidos tumorales de UMUC-14. Se recogieron tumores de xenoinjerto de UMUC-14 que se trataron con 30 mg/kg de un anticuerpo de control (Ctrl) o R3Mab durante 24 horas o 72 horas (n = 3 por grupo), se homogeneizaron y se analizaron en cuanto al dímero-monómero de FGFR3^{S249C} así como la activación de MAPK mediante inmunotransferencia. El dímero-monómero de FGFR3 se detectó utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-FGFR3 sc9007 para evitar la interferencia de la IgG de ratón en los lisados tumorales. Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 14: La ADCC contribuye a la eficacia antitumoral de R3Mab en modelos de mieloma múltiple positivos para t(4;14). (A-B) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos de mieloma de OPM2 (A) y KMS11 (B) preestablecidos. n = 10 por grupo. (C-F) Citólisis de las líneas celulares de mieloma OPM2 (C) y KMS11 (D), o de las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 (E) y UMUC-14 (F) inducida por R3Mab en cultivo celular. Se incubaron células de mieloma o de cáncer de vejiga con CMSP humanas recién aisladas en presencia de R3Mab o de un anticuerpo de control. La citotoxicidad se determinó midiendo la LDH liberada en el sobrenadante. (G-H) Efecto de R3Mab o su mutante DANA sobre el crecimiento de xenoinjertos de mieloma de OPM2 (G) y KMS11 (H) preestablecidos. n=10 por grupo. Las barras de error representan el ETM y, en algunos casos, son más pequeñas que los símbolos.

FIGURA 15: La atenuación génica de FGFR3 con ARNip inhibe la proliferación celular de líneas celulares de cáncer de vejiga. En Genentech se diseñaron y sintetizaron de seis a siete ARNip de FGFR3 distintos y tres ARNip no específicos de control. Se sembraron en una placa de 96 pocillos (3000 células por pocillo) las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 (A), SW780 (B), RT4 (C) y UMUC-14 (D) y se dejaron adherir durante una noche, y se transfectoron transitoriamente con ARNip 25 nM formando un complejo con ARNiMax (Invitrogen). 72 horas postransfección, se añadió [³H]-timidina (1 µCi por pocillo) al cultivo (A, C y D) durante otras 16 horas de incubación. La [³H]-timidina incorporada se cuantificó con TopCount. Los datos se normalizaron con respecto a los de las células transfectadas con RNAiMax solo (simulacro). Las barras de error representan el ETM. Cuadro inferior: Transferencias representativas que muestran la expresión de FGFR3 en células transfectadas con ARNip. (B) La viabilidad celular se midió con CellTiter-Glo (Promega) 96 horas después de la transfección. Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 16: La atenuación génica de FGFR3 en la línea celular de cáncer de vejiga RT112 induce la detención del ciclo celular en G1 *in vitro* y suprime el crecimiento tumoral *in vivo*. Se diseñaron y clonaron tres ARN de FGFR3

distintos en un vector retroviral de expresión de ARNhc inducible por Tet. Se establecieron clones estables de RT112 que expresaban ARNhc de FGFR3 o ARNhc de control con selección de puomicina. (A) Histogramas de citometría de flujo de fluorescencia de ADN de núcleos teñidos con yoduro de propidio (PI) obtenidos de células estables RT112 que expresan ARNhc2 o ARNhc6 de FGFR3 después del tratamiento con o sin doxiciclina 1 µg/ml durante 72 horas. (B) El crecimiento de células estables RT112 que expresaban ARNhc2-4 de FGFR3 (n = 11 por grupo de tratamiento) o ARNhc6-16 de FGFR3 (n = 10 por grupo de tratamiento) en ratones nu/nu. Los ratones con tumores recibieron solo sacarosa al 5 % (círculo relleno) o sacarosa al 5 % más doxiciclina 1 mg/ml (cuadrado relleno), y los tumores se midieron con calibradores dos veces por semana. Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 17: Efecto de los anticuerpos de hibridoma anti-FGFR3 16G, 6G1 y 15B2 sobre la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3 de tipo silvestre y mutado. Se generaron anticuerpos de hibridoma anti-FGFR3 inmunizando ratones BALB/c con FGFR3-IIIb /Fc humano o quimera FGFR3-IIIc humano /Fc. Las células de hibridoma fusionadas se seleccionaron usando selección por hipoxantina-aminopterina-timidina en Medio D del kit de selección de hibridomas ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá). Los anticuerpos de hibridoma se cribaron secuencialmente en cuanto a su capacidad para unirse a FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc mediante ELISA y para reconocer el FGFR3 de la superficie celular mediante FACS. A continuación, los hibridomas seleccionados se clonaron mediante dilución limitante. 16G, 6G1 y 15B2 son clones usados para evaluar el efecto sobre la proliferación de células Ba/F3 que expresan FGFR3 de tipo silvestre o mutado de forma similar a como se describe en la Figura 9A. Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 18: Comparación de epítomos de R3Mab determinados por mapeo peptídico y análisis de la estructura cristalina. (A) Epítipo revelado por la estructura del fragmento Fab de R3Mab formando un complejo con el segmento extracelular IgD2-D3 del FGFR3 humano. Los restos de FGFR3 en contacto con la cadena pesada y la cadena ligera del Fab están coloreados en negro y gris, respectivamente. (B) Ubicación de los péptidos 3 y 11 en FGFR3.

FIGURA 19: R3Mab inhibe la proliferación y la señalización de FGFR3 en células de cáncer de vejiga que contienen o FGFR3^{S249C} mutado o de TS. (A) Inhibición de la viabilidad celular mediante R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RT4. La viabilidad celular se evaluó con CellTiter-Glo (Promega) después de 96 horas de incubación con el anticuerpo. Las barras de error representan el ETM. (B) Bloqueo de la señalización de FGFR3 activada por FGF1 mediante R3Mab (15 µg/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga RT4. (C) Inhibición de la incorporación de [³H]-timidina mediante R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RCC-97-7 (que contiene FGFR3^{S249C}). Las barras de error representan el ETM. (D) Inhibición de la fosforilación de FGFR3 en células TCC-97-7 mediante R3Mab (15 µg/ml). (E) Disminución de dímero de FGFR3^{S249C} en células TCC-97-7 después de 3 horas de incubación con R3Mab (15 µg/ml) en comparación con un anticuerpo de control (Ctrl).

FIGURA 20: Efecto de inhibidores de la endocitosis sobre la internalización de R3Mab y del dímero de FGFR3^{S249C} en células UMUC-14. (A) Efecto de inhibidores de la endocitosis sobre la internalización de R3Mab. Se incubaron células UMUC-14, pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis o DMSO durante 1 hora a 37 °C, con R3Mab (15 µg/ml) durante 3 horas a 37 °C para permitir la internalización. Se usó un lavado a pH bajo para eliminar el R3Mab de la superficie celular para visualizar el anticuerpo internalizado. Las células se fijaron y tiñeron con anti-IgG humana marcado con Alexa 488. La imagen se tomó usando microscopía confocal. (B) Efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre el dímero de FGFR3^{S249C} en células UMUC-14 tratadas con R3Mab. Se incubaron células UMUC-14, pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis o DMSO durante 1 hora a 37 °C de forma simulada (carril 1), con un anticuerpo de control (carril 2) o con R3Mab (15 µg/ml, carril 3) durante 3 horas a 37 °C. Los lisados celulares se analizaron en cuanto a la proteína FGFR3 en condiciones no reductoras o reductoras mediante inmunotransferencia. Obsérvese que la clorpromacina (inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina) y la genisteína (paninhibidor de la endocitosis) bloquearon la internalización de R3Mab, pero no tuvieron ningún efecto sobre la disminución de dímero de FGFR3^{S249C} inducida por R3Mab.

FIGURA 21: Sensibilidad de detección de distintos anticuerpos anti-FGFR3 frente a FGFR3^{S249C} monomérico y dimérico en condiciones no reductoras. Las células UMUC-14 se lisaron después del tratamiento con R3Mab (carril 1), una IgG1 de control (carril 2) o PBS (carril 3) durante 3 horas, y los lisados celulares se sometieron a análisis por inmunotransferencia en condiciones reductoras o no reductoras. Obsérvese que 6G1 (anticuerpo de hibridoma murino generado en Genentech) detectó tanto el dímero como el monómero de FGFR3^{S249C}, mientras que sc9007 (anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology) o sc13121 (anticuerpo de hibridoma murino, Santa Cruz Biotechnology) detectaron preferentemente FGFR3^{S249C} dimérico.

FIGURA 22: Efecto de R3Mab sobre la proliferación de células de mieloma múltiple t(4;14)+. (A) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la incorporación de [³H]-timidina por parte de las células UTMC-2. Las células UTMC-2 se cultivaron en medio que contenía R3Mab o un anticuerpo de control en presencia de FGF9 25 ng/ml y heparina 5 µg/ml o solo heparina (sin FGF9). Después de 6 días de incubación, se añadió [³H]-timidina durante 16 horas de incubación. Los datos se normalizaron con respecto a los de las células cultivadas en ausencia de FGF9 y anticuerpo. (B-C) Efecto de R3Mab sobre la incorporación de [³H]-timidina por parte de células OPM2 (B) y KMS11 (C). Las células cultivadas en medio con SFB al 1,5 % se trataron con R3Mab o con un anticuerpo de control durante 6 días. Los datos se normalizaron con respecto a los de las células no tratadas. Las barras de error representan el ETM.

FIGURA 23: Niveles de expresión de FGFR3 en la superficie celular en células de mieloma y de cáncer de vejiga. (A) Expresión de FGFR3 en la superficie celular en células de mieloma y células de cáncer de vejiga evaluada mediante análisis por FACS. Las células se tiñeron con mAb de ratón conjugado con ficoeritrina contra FGFR3 humano (FAB766P, R&D Systems) o IgG1 de ratón de control de isotipo conjugado con ficoeritrina (BD

Pharmingén). (B) Análisis de Scatchard de la densidad de FGFR3 en células de mieloma y células de cáncer de vejiga. R3Mab se radiyodó y se incubó con células en suspensión con un exceso de anticuerpo no marcado. Después de incubar a TA durante 2 horas, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron dos veces. Se determinó el ^{125}I unido de forma específica. La densidad del receptor y la afinidad de unión (Kd) representan la media de dos experimentos de unión.

FIGURA 24: Efecto de R3Mab o de su mutante DANA sobre el crecimiento de xenoinjertos de células de carcinoma de vejiga. (A) Efecto de R3Mab y de su mutante DANA (50 mg/kg cada uno) sobre el crecimiento de tumores de RT112 preestablecidos. (B) Efecto de R3Mab y de su mutante DANA (50 mg/kg cada uno) sobre el crecimiento de tumores de UMUC-14 preestablecidos. Las barras de error representan el ETM.

Descripción detallada de la invención

La divulgación en el presente documento proporciona anticuerpos anti-FGFR3 que son útiles para, por ejemplo, el tratamiento o la prevención de patologías asociadas con la expresión y/o la actividad de FGFR3, tales como la expresión y/o la actividad aumentadas o la expresión y/o la actividad no deseadas como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se usan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno de proliferación celular.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 de la divulgación encuentran utilidad como reactivos para la detección y/o el aislamiento de FGFR3, tal como la detección de FGFR3 en diversos tejidos y tipos de células.

La divulgación proporciona además métodos de fabricación y uso de anticuerpos anti-FGFR3 y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-FGFR3.

Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento, son generalmente bien entendidos y habitualmente empleados utilizando metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En aspectos preferidos, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determinó por el método de Lowry, y lo muy preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Por lo general, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia normalmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o configuración distinta de en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo) donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica distintas de la de las células naturales.

La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de

acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

- 5 La expresión "sustancialmente similar", o "sustancialmente el mismo", como se usa en el presente documento, indica un grado de similitud suficientemente elevado entre dos valores numéricos (normalmente uno asociado con un anticuerpo de la divulgación y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de tal forma que un experto en la materia podría considerar que la diferencia entre los dos valores tendría una significación biológica y/o estadística pequeña o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia ente dichos dos valores es preferentemente de menos de aproximadamente el 50 %, preferentemente de menos de aproximadamente el 40%, preferentemente de menos de aproximadamente el 30%, preferentemente de menos de aproximadamente el 20%, preferentemente de menos de aproximadamente el 10 % en función del valor del anticuerpo de referencia/comparación.
- 10
- 15 "Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (Kd). Convenientemente, la Kd es de 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , o incluso 1×10^{-10} o más fuerte. La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. Se conoce en la técnica diversos métodos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente divulgación. A continuación, se describen aspectos ilustrativos específicos.
- 20
- 25

En un aspecto, la "Kd" o el "valor de Kd" de acuerdo con la presente divulgación se mide mediante un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125} I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dy nex) se recubren durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan [^{125} I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, concordante con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Después, el Fab de interés se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de ello, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otro aspecto, la Kd o el valor de Kd se mide mediante ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie con factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. En algunos aspectos, se utilizan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmón superficial: el anticuerpo se inmoviliza en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 400 UR, y para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie con factor dos de proteína diana (por ejemplo, FGFR3-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en tampón PBST a 25 °C con un caudal de aproximadamente 30 µl/minuto. Las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (programa informático de evaluación de BIAcore versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno (forma Fab) 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes

30

35

40

45

50

55

60

65

de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro de la serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "constante de asociación" o "tasa de asociación" o "velocidad de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con la presente divulgación también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficiales descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie con factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. En algunos aspectos, se utilizan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmón superficial: el anticuerpo se inmoviliza en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 400 UR, y para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie con factor dos de proteína diana (por ejemplo, FGFR3-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en tampón PBST a 25 °C con un caudal de aproximadamente 30 µl/minuto. Las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo simple de unión de Langmuir de uno a uno (programa informático de evaluación de BIAcore versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Sin embargo, si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la constante de asociación se determina preferentemente usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno (forma Fab) 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro de la serie 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, dado que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. En caso de que estén presentes, pueden impartirse modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protecciones", la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), las que contienen restos pendientes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, las que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos, alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, puede sustituirse cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse mediante grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o pueden conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse por aminas o fracciones de grupo de protección orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse en grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares

epiméricos tales como arabinosa, xilasas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido básico, tales como metil ribósido. Pueden sustituirse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, aspectos en donde el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada R o R' son independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ADN y ARN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que son generalmente, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos es igual y totalmente aplicable a los oligonucleótidos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia peptídica o polipeptídica se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tomar en consideración ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede realizarse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en, por ejemplo, documento WO2007/001851. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para establecer comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

En algunos aspectos, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % idénticas. En algunos aspectos, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos el 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso 100 % idénticas. A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

El término "FGFR3", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que especifique o contextualmente se indique otra cosa, a cualquier polipéptido FGFR3 nativo o variante (ya sea nativo o sintético) (por ejemplo, la isoforma FGFR3-IIIb o la isoforma FGFR3-IIIc). La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembranaria), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "FGFR3 de tipo silvestre" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína FGFR3 de origen natural. La expresión "secuencia de FGFR3 de tipo silvestre" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en un FGFR3 de origen natural.

La expresión "ligando de FGFR3", (denominado indistintamente "FGF") como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que especifique o contextualmente se indique otra cosa, a cualquier polipéptido ligando de FGFR3 (por ejemplo, FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17, FGF18, FGF23) nativo o variante (ya sea nativo o sintético). La expresión "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas de origen natural (por ejemplo, una

secuencia de dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembranaria), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas de origen natural. La expresión "ligando de FGFR3 de tipo silvestre" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína ligando de FGFR3 de origen natural. La expresión "secuencia de ligando de FGFR3 de tipo silvestre" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en un ligando de FGFR3 de origen natural.

"Activación de FGFR3" se refiere a la activación, o fosforilación, del receptor FGFR3. Generalmente, la activación de FGFR3 da como resultado la transducción de señales (por ejemplo, la provocada por un dominio cinasa intracelular de un receptor FGFR3 que fosforila restos de tirosina en FGFR3 o un polipéptido sustrato). La activación de FGFR3 puede estar mediada por la unión del ligando de FGFR a un receptor de FGFR3 de interés. La unión del ligando de FGFR3 (por ejemplo, tal como FGF1 o FGF9) a FGFR3 puede activar un dominio cinasa de FGFR3 y, por lo tanto, dar como resultado la fosforilación de restos de tirosina en el FGFR3 y/o la fosforilación de restos de tirosina en un polipéptido (o polipéptidos) de sustrato adicionales.

El término "constitutivo", como se usa en el presente documento, como por ejemplo, aplicado a la actividad del receptor cinasa, se refiere a la actividad de señalización continua de un receptor que no depende de la presencia de un ligando u otras moléculas activadoras. Dependiendo de la naturaleza del receptor, toda la actividad puede ser constitutiva o la actividad del receptor puede activarse aún más mediante la unión de otras moléculas (por ejemplo, ligandos). Los sucesos celulares que conducen a la activación de los receptores son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la activación puede incluir oligomerización, por ejemplo, dimerización, trimerización, etc., en complejos receptores de orden superior. Los complejos pueden comprender una sola especie de proteína, es decir, un complejo homomérico. Como alternativa, los complejos pueden comprender al menos dos especies de proteínas distintas, es decir, un complejo heteromérico. La formación de complejos puede estar provocada por, por ejemplo, sobreexpresión de formas normales o mutantes del receptor en la superficie de una célula. La formación de complejos también puede estar provocada por una mutación o mutaciones específicas en un receptor.

La expresión "independiente de ligando" como se usa en el presente documento, como, por ejemplo, aplicado a la actividad de señalización del receptor, se refiere a la actividad de señalización que no depende de la presencia de un ligando. Un receptor que tenga actividad cinasa independiente de ligando no impedirá necesariamente la unión del ligando a ese receptor para producir una activación adicional de la actividad cinasa.

La expresión "dependiente de ligando" como se usa en el presente documento, como, por ejemplo, aplicado a la actividad de señalización del receptor, se refiere a la actividad de señalización que depende de la presencia de un ligando.

La expresión "amplificación de genes" se refiere a un proceso mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o un fragmento génico en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) a menudo se denomina "amplicón". Habitualmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta la relación del número de copias fabricadas del gen particular expresado.

Un "inhibidor de tirosina cinasa" es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina cinasa de una tirosina cinasa tal como un receptor de FGFR3.

Una muestra biológica o de cáncer que "presenta expresión, amplificación o activación de FGFR3", es una que, en un ensayo diagnóstico, expresa (incluso sobreexpresa) FGFR3, tiene el gen de FGFR3 amplificado y/o demuestra de otra manera la activación o la fosforilación de un receptor FGFR3.

Una muestra de cáncer o biológica que "presenta activación de FGFR3" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de FGFR3. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "presenta activación constitutiva de FGFR3" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra activación constitutiva o fosforilación de un FGFR3. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de c-FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "presenta amplificación de FGFR3" es una que, en un ensayo diagnóstico, tiene amplificado el gen de FGFR3.

Una muestra de cáncer o biológica que "presenta translocación de FGFR3" es una que, en un ensayo diagnóstico, tiene translocado el gen de FGFR3. Un ejemplo de una translocación de FGFR3 es la translocación t(4;14), que se produce en algunos tumores de mieloma múltiple.

Un "ensayo de fosfo-ELISA" en el presente documento es un ensayo en que la fosforilación de uno o más FGFR3, el sustrato o las moléculas de señalización aguas abajo se evalúan en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un reactivo, generalmente un anticuerpo, para detectar FGFR3, sustrato o una molécula de

señalización corriente abajo fosforilados. En algunos aspectos, se usa un anticuerpo que detecta FGFR3 o pMAPK fosforilados. El ensayo se puede realizar en lisados celulares, preferentemente de muestras biológicas frescas o congeladas.

5 Una muestra de cáncer o biológica que "presenta activación de FGFR3 independiente de ligando" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de un FGFR3 independiente de ligando. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

10 Una muestra de cáncer o biológica que "presenta activación de FGFR3 dependiente de ligando" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de un FGFR3 dependiente de ligando. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

15 Una muestra de cáncer o biológica que "presenta activación de FGFR3 independiente de ligando" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de un FGFR3 independiente de ligando. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

20 Una célula cancerosa con "sobrexpresión o amplificación FGFR3" es una que tiene niveles significativamente más altos de una proteína o gen de FGFR3 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o traducción aumentadas. La sobreexpresión o amplificación de FGFR3 puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína FGFR3 presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHQ). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica FGFR3 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de tipo southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Además de los anteriores ensayos, están disponibles para el experto diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo, mediante exploración externa por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

30 El término "mutación", como se usa en el presente documento, significa una diferencia en la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de una proteína o ácido nucleico particular (gen, ARN) con respecto a la proteína o ácido nucleico de tipo silvestre, respectivamente. Una proteína o ácido nucleico mutado puede expresarse o encontrarse en un alelo (heterocigótico) o en ambos alelos (heterocigótico) de un gen, y puede ser somático o de estirpe germinal. En la presente divulgación, las mutaciones son generalmente somáticas. Las mutaciones incluyen reordenamientos de secuencia tales como inserciones, deleciones y mutaciones puntuales (incluidos los polimorfismos de un solo nucleótido/aminoácido).

40 "Inhibir" es disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia.

Un agente posee "actividad o función agonista" cuando un agente imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ejemplo, ligando de FGFR, tal como FGF1 o la FGF9).

45 Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ejemplo, ligando de FGFR, tal como FGF1 o la FGF9).

"Expresión" de proteínas se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y luego en la proteína.

50 En el presente documento, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (tal como un receptor de FGF o un ligando de receptor de FGF) es una en que el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, incluyendo fragmentos de los mismos, se determina que está presente en la muestra o célula.

55 Un "inmunoconjugado" (denominado indistintamente como "conjugado de fármaco-anticuerpo", o "ADC" (del inglés *antibody-drug conjugate*) significa un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

60 La expresión "región Fc", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a un complejo dimérico que comprende las secuencias polipeptídicas carboxiterminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, en donde una secuencia polipeptídica carboxiterminal es la que se puede obtener por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias del Fc nativas o variantes. Aunque los límites de la secuencia del Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, habitualmente se define que la secuencia del Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición Cys226, o desde

aproximadamente Pro230, al extremo carboxilo de la secuencia del Fc. La secuencia del Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un anticuerpo con K447, con la totalidad de K447 eliminada o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Por "polipéptido Fc" en el presente documento se entiende uno de los polipéptidos que forman una región Fc. Un polipéptido Fc se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunos aspectos, un polipéptido Fc comprende parte o la totalidad de una secuencia de la bisagra de tipo silvestre (generalmente en su extremo N). En algunos aspectos, un polipéptido Fc no comprende una secuencia de la bisagra funcional o de tipo silvestre.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como una fracción citotóxica o radiomarcador.

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno al que se une un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Para aumentar la semivida de los anticuerpos o polipéptidos que contienen las secuencias de aminoácidos de la presente divulgación, se puede unir un epítipo de unión al receptor de rescate al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión al receptor de rescate puede unirse en marco de lectura a un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de la presente divulgación, de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico modificada por ingeniería genética comprende el epítipo de unión al receptor de rescate y una secuencia polipeptídica de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de Ig (por ejemplo, Ghetie *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabla 1). También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero aumentadas en los documentos WO00/42072, WO 02/060919; Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). En otro aspecto también se puede aumentar la semivida en suero, por ejemplo, uniendo otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la divulgación se pueden unir a la seroalbúmina o a una porción de la seroalbúmina que se une al receptor FcRn o a un péptido de unión a la seroalbúmina para que la seroalbúmina se una al anticuerpo o polipéptido, por ejemplo, tales secuencias polipeptídicas se divulgan en el documento WO01/45746. En un aspecto preferido, el péptido de seroalbúmina a unir comprende una secuencia de aminoácidos de DICKPRWGCLW (SEQ ID NO: 183). En otro aspecto, estos métodos aumentan la semivida de un Fab. Véase también, Dennis *et al.* *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) en cuanto a las secuencias peptídicas de unión a seroalbúmina.

Por "fragmento" se entiende una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la longitud total del polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 200, 300, 400, 500, 600 o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

La expresión "función agonista escasa o nula" con respecto a un anticuerpo de la divulgación como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo no suscita una cantidad biológicamente significativa de actividad agonista, por ejemplo, tras la administración a un sujeto. Como se entenderá en la técnica, la cantidad de una actividad puede determinarse cuantitativa o cualitativamente, siempre que se pueda realizar una comparación entre un anticuerpo de la divulgación y una contraparte de referencia. La actividad puede medirse o detectarse de acuerdo con cualquier ensayo o técnica conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las descritas en el presente documento. La cantidad de actividad para un anticuerpo de la divulgación y su contraparte de referencia se puede determinar en paralelo o en ejecuciones distintas. En algunos aspectos, un anticuerpo bivalente de la divulgación no posee una función agonista sustancial.

Las expresiones "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada

o controlada de muerte celular en los mamíferos que normalmente va acompañada de uno o más cambios celulares característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del ADN cromosómico o la pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, por ensayos de viabilidad celular, análisis de FACS o electroforesis de ADN, y más específicamente por unión de anexina V, fragmentación de ADN, reducción del volumen celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

Las expresiones "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (como se describe con más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con afinidad madurada.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de anticuerpo. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (las CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β , conectadas mediante tres CDR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura en lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de y unión a antígeno. En una especie de Fv bicatenario, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv monocatenario, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración donde las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en los que el resto (o los restos) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando están presentes

en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En un aspecto, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otro aspecto, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de CCDA y unión al complemento. En un aspecto, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Para, por ejemplo, tal fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Se utilizan varias delineaciones de regiones hipervariables que se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan mediante el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

	Bucle de Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	--- -----	----	----	----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL and 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los restos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente para cada una de estas definiciones.

Los restos de "región marco conservada" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de regiones hipervariables como se define en el presente documento.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u

- homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos obtenidos a partir de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado, como se usa en el presente documento, es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.
- Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).
- Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto sintético o de origen natural. Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.
- El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos con más detalle en, por ejemplo, documento EP 404.097; documento WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).
- Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha fabricado usando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos.
- Un anticuerpo "con afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más de las CDR del mismo, lo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha modificación (o modificaciones). Los anticuerpos con afinidad madurada preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos con afinidad maduradas se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante la combinación de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los restos de CDR y/o de armazón se describe por: Barbas *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).
- Las "funciones efectoras" del anticuerpo hacen referencia a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o una región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; disminución a la baja de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.
- La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida en los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan de manera específica a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente destruyan a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro* tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337 o en la patente de EE. UU. n.º 6.737.056. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, PNAS (USA) 95:652-656 (1998).
- Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que participan en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las CMSP y los linfocitos NK.

Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural, por ejemplo, de la sangre.

Un "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen a FcγRIIA (un "receptor activador") y a FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM, del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) en su dominio citoplásmico. El receptor FcγRIIB inhibidor contiene un motivo de inhibición inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM; del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) en su dominio citoplásmico. (véase la revisión de M. en Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas. El documento WO 00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión a los FcR mejorada o disminuida. Véase, también, Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Se conocen métodos para medir la unión al FcRn (véanse, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad al FcRn humano puede analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se les administran los polipéptidos de variantes de Fc.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con alteración en las secuencias de aminoácidos de la región Fc y una capacidad de unión a C1q disminuida o aumentada se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1 y el documento WO 99/51642.

Véase, también, Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

La expresión "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante purificación del polipéptido o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc de acuerdo con la presente divulgación puede comprender polipéptidos con K447, con la totalidad de K447 eliminada o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

Un "armazón aceptador humano", para los fines del presente documento, es un armazón que comprende la secuencia de aminoácidos de un armazón de VL o VH obtenida de un armazón de inmunoglobulina humana, o un armazón consenso humano. Un armazón humano aceptador "obtenido de" un armazón de inmunoglobulina humana o de un armazón consenso humano pueden comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistente. Cuando los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes, preferentemente están presentes no más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. Cuando los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en una VH, preferentemente los cambios son solo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los restos de aminoácidos en las posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En un aspecto, el armazón aceptador humano de VL es idéntico en secuencia a la secuencia del armazón de VL de inmunoglobulina humana o a la secuencia de armazón consenso humano.

Un "armazón consenso humano" es un armazón que representa los restos de aminoácidos que se encuentran más habitualmente en una selección de secuencias de armazón de VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.* En un aspecto, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.* En un aspecto, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III según Kabat *et al.*

Un "armazón de consenso del subgrupo III de VH" comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de pesada variable de Kabat *et al.* En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de armazón consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:184)-H1-WVRQAPGKGLEWV
(SEQ ID NO:185)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:186)-
H3-WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:187).

Un "armazón de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I de kappa ligera variable de Kabat *et al.* En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de armazón consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:188)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY
(SEQ ID NO:189)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (SEQ ID NO:190)-
L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:191).

Como se usa en el presente documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo en donde se han modificado uno o más de los restos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie. Dichos mutantes necesariamente tienen menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de especie. En un aspecto, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tendrá al menos el 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de especie, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y muy preferentemente, de al menos el 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similares (es decir, un resto de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades comunes de las cadenas laterales, véase más adelante) con los restos del anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones aminotermiales, carboxitermiales o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretarán como que afectan la identidad o similitud de secuencia

Un "trastorno" o "enfermedad" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la divulgación. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen las patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesitan tratamiento son las que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellas en las que se quiere prevenir la aparición o reaparición del cáncer. Las personas que necesitan tratamiento son las que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellas en las que se quiere prevenir la aparición o recidiva del cáncer.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede, por ejemplo, medirse evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP, por sus siglas en inglés), las tasas de respuesta (TR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por "cáncer en estadio temprano" o "tumor en estadio temprano" se entiende un cáncer que no es invasivo o metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, I o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluido el neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Algunos ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón que incluye

- cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, lo que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluido el cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, 5 cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de las vías biliares, así como cáncer de cabeza y cuello y mieloma múltiple.
- 10 El término "precanceroso" se refiere a una afección o un crecimiento que normalmente precede o se convierte en cáncer. Un crecimiento "precanceroso" tendrá células que se caracterizan por una regulación del ciclo celular, proliferación o diferenciación anómalas, que puede determinarse mediante marcadores de la regulación del ciclo celular, de proliferación o de diferenciación celular.
- 15 Por "displasia" se entiende cualquier crecimiento o desarrollo anómalo de tejido, órgano o células. Preferentemente, la displasia es de alto grado o precancerosa.
- Por "metástasis" se entiende la diseminación del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través 20 del torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (producir metástasis) en tejidos normales de cualquier otro sitio del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, sujeto al desprendimiento de células tumorales del tumor primario, que viajan a través del torrente sanguíneo y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen una irrigación sanguínea y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal.
- 25 Las rutas moleculares tanto estimulantes como inhibitoras dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y también son importantes las interacciones entre la célula tumoral y las células del hospedador en el sitio distante.
- Por "no metastásico" se entiende un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y no ha penetrado 30 en el sistema vascular linfático o sanguíneo o en los tejidos diferentes del sitio primario. Generalmente, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que es un cáncer de estadio 0, I o II y ocasionalmente en cáncer de estadio III.
- Por "tumor primario" o "cáncer primario" se entiende el cáncer original y no una lesión metastásica localizada en otro tejido, órgano o localización del cuerpo del sujeto. 35
- Por "tumor benigno" o "cáncer benigno" se entiende un tumor que permanece localizado en el sitio de origen y que no tiene la capacidad de infiltrar, invadir o producir metástasis en un sitio distante.
- Por "masa tumoral" se entiende el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor o la cantidad de cáncer en 40 el cuerpo. La masa tumoral también se denomina carga tumoral.
- Por "número de tumores" se entiende el número de tumores.
- Por "sujeto" se entiende un individuo, incluyendo, pero sin limitarse a, un ser humano o un mamífero no humano, tal 45 como bóvido, équido, cánido, óvido o félido. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.
- La expresión "terapia contra el cáncer" se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, pero se limita a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes 50 inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar cáncer, anticuerpos anti-CD20, inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR beta, BlyS, APRIL, BCMA o un receptor (o receptores) de VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Las combinaciones de los mismos también se 55 incluyen en la divulgación.
- La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o produce la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas 60 enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.
- Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos, tales 65 como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluida altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y

trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1I y caliqueamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína)), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antisuipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbamina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin cremophor, formulación de paclitaxel de nanopartículas modificadas por ingeniería genética albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluido el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; VELCADE bortezomib; REVLIMID lenalidomida; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluido el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (los SERM, forma siglada de *selective estrogen receptor modulator*), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON-toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®, y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, rmRH ABARELIX®, Vinorelbina y Espiramicinas (véase la Patente de EE. UU. n.º 4.675.187) y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

El término "profármaco", como se usa en la presente solicitud, se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y tiene la capacidad de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma precursora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-

aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por "radioterapia" se entiende el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir un daño suficiente a una célula a fin de limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir por completo la célula. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se administran como una administración única y las dosis típicas varían de 10 a 200 unidades (Gray) al día.

Una "muestra biológica" (denominada indistintamente "muestra" o "muestra de tejido o de células") abarca diversos tipos de muestras obtenidas de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como una muestra de ensayo de biopsia o cultivos de tejido o células obtenidas de los mismos, y la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que se han manipulado de alguna manera después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento respecto de determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o la inclusión en una matriz semisólida o sólida con fines de corte. La expresión "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, líquido biológico y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser un tejido sólido como el de una muestra de órgano o tejido fresco, congelado y/o conservado, o una biopsia o un aspirado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; líquidos corporales, tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento durante la gestación o el desarrollo del individuo. En algunos aspectos, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no están naturalmente mezclados con el tejido en la naturaleza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines del presente documento, un "corte" de una muestra de tejido significa una sola parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, tal como un fino corte de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que se pueden tomar múltiples cortes de muestras de tejido y someterlas a análisis de acuerdo con la presente divulgación. En algunos aspectos, el mismo corte de muestra de tejido se analiza a niveles tanto morfológicos como moleculares, o se analiza con respecto a proteínas y ácidos nucleicos.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El marcador puede ser detectable en sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Composiciones y métodos de la invención

La presente divulgación abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-FGFR3; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti-FGFR3. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a FGFR3 y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a FGFR3. Estas composiciones pueden comprender además transportadores adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables, incluidos tampones, que son bien conocidos en la técnica.

La divulgación también abarca aspectos de anticuerpos y polinucleótidos aislados. La divulgación también abarca aspectos de anticuerpos y polinucleótidos sustancialmente puros.

La divulgación también abarca un método para tratar un trastorno, por ejemplo, el mieloma múltiple o el carcinoma en etapa de transición (por ejemplo, carcinoma invasivo en estadio de transición) usando un anticuerpo anti-FGFR3 (como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica).

Composiciones

Los anticuerpos anti-FGFR3 de la divulgación son preferentemente monoclonales. Además, se divulgan fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-FGFR3 proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear por medios tradicionales, tal como digestión enzimática, o pueden generarse mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen a continuación.

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen

natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos aislados.

Los anticuerpos monoclonales anti-FGFR3 de la divulgación se pueden fabricar utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza para suscitar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos contra FGFR3 pueden generarse en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de FGFR3 y un adyuvante. El FGFR3 puede prepararse usando métodos muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la producción recombinante de FGFR3 humano y de ratón se describe a continuación. En un aspecto, los animales se inmunizan con un FGFR3 fusionado con la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En un aspecto preferido, los animales se inmunizan con una proteína de fusión FGFR3-IgG1. Normalmente, los animales se inmunizan contra conjugados inmunogénicos o derivados de FGFR3 con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas más tarde, los animales reciben dosis de refuerzo. 7 a 14 días después, se extrae sangre de los animales y se somete a ensayo el suero en cuanto al título anti-FGFR3. Los animales reciben dosis de refuerzo hasta la meseta del título.

Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y dejan crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT, por sus siglas en inglés), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son las que se fusionan de manera eficaz, sustentan la producción estable de altos niveles de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferentes son las líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU. y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. Se han descrito también líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se hacen crecer las células de hibridoma se somete a ensayo en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra FGFR3. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos anti-FGFR3 de la divulgación pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para cribar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen fagos que expresan diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionada a la proteína de la cubierta del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, por tanto, se separan de los clones que no se unen en la

biblioteca. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Se puede obtener cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR3 de la divulgación diseñando un procedimiento de cribado de antígeno adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-FGFR3 de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y las secuencias de la región constante (Fc) adecuada descritas en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que presentan tres bucles hipervariables o regiones determinantes de (las CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en un fago, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto flexible, o como fragmentos Fab, en que cada uno se fusiona con un dominio constante e interactúa de forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago de Fv" o "clones de Fv".

Los repertorios de los genes de VH y VL pueden clonarse por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en bibliotecas de fagos, que luego pueden examinarse en cuanto a clones de unión a antígeno, como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como describen Griffiths *et al.*, EMBO J, 12: 725-734 (1993). Para finalizar, también pueden producirse sintéticamente bibliotecas vírgenes clonando segmentos génicos V no reordenados de células madre y usando cebadores para PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro* como describen Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

El fago filamentoso se usa para presentar fragmentos de anticuerpos por fusión con la proteína pIII de cubierta menor. Los fragmentos de anticuerpos se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como describen Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde se ensambla una estructura de Fab-proteína de cubierta que se presenta en la superficie del fago al desplazar algunas de las proteínas de cubierta de tipo silvestre, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada a favor de los clones anti-FGFR3, el individuo se inmuniza con FGFR3 para generar una respuesta de anticuerpos, y las células del bazo y/o los linfocitos B circulantes y otros linfocitos de sangre periférica (los PBL, del inglés *peripheral blood lymphocytes*) se recuperan para la construcción de la biblioteca. En un aspecto preferido, se obtiene una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de los clones anti-FGFR3 mediante la generación de una respuesta de anticuerpos anti-FGFR3 en ratones transgénicos que portan un conjunto de genes de inmunoglobulinas humanas funcionales (y que carecen de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógeno) de forma que la inmunización con FGFR3 da lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos contra FGFR3. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe a continuación.

Se puede obtener un enriquecimiento adicional para las poblaciones de células reactivas anti-FGFR3 mediante el uso de un procedimiento de cribado adecuado para aislar los linfocitos B que expresan el anticuerpo unido a la membrana específico para FGFR3, por ejemplo, por separación celular con cromatografía de afinidad para FGFR3 o adsorción de células a FGFR3 marcado con fluorocromo seguido de separación celular activada por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que FGFR3 no es antigénico. Para bibliotecas que incorporen la construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, las células madre se recogen del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener de diversas especies animales, tal como un ser humano, ratón, rata, lagomorfos, luprino, cánido, felino, suino, bóvido, équido y especies aviares, etc.

Los segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes de VH y VL reordenados, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN genómico o el ARNm de los linfocitos seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que hibridan con los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), creando así diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir de ADNc y de ADN

genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). Preferentemente, la diversidad de la biblioteca se maximiza mediante el uso de cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todos los ordenamientos de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción raros dentro del cebador de PCR como etiqueta en un extremo, como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante una amplificación por PCR adicional con un cebador etiquetado como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

Se pueden obtener *in vitro* repertorios de genes V reordenados sintéticamente a partir de segmentos del gen V. La mayoría de los segmentos de genes de VH humana se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y mapeado (informado en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluidas todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud, como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden fabricar con toda la diversidad de secuencias enfocada en un bucle largo H3 de una sola longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos de Vk y Vl humanas (informado en Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y puede usarse para hacer repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gama de pliegues de VH y VL, y de longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de una diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes de V, los segmentos de genes V de la estirpe germinal se pueden reordenar *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpos se pueden construir combinando los repertorios de genes de VH y VL de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en distintos vectores, y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128:119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. A continuación, las dos bibliotecas se combinan mediante la infección con fagos de bacterias que contienen fagémido, de modo que cada célula contenga una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca esté limitado solo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales para la recombinación *in vivo* para que los genes de VH y VL se recombinen en un solo replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan un gran número de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), o ensamblarse mediante PCR y luego clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también se puede usar para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenario (scFv). En otra técnica más, el "ensamblaje de PCR en células" se usa para combinar genes de VH y VL dentro de los linfocitos mediante PCR y luego clonar repertorios de genes unidos como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas vírgenes (ya sean naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y volviendo a seleccionar de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), citado anteriormente. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente *in vitro* mediante el uso de una polimerasa propensa a errores (informado en Leung *et al.*, Technique, 1:11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de la afinidad se puede realizar mediante la mutación aleatoria de una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que porten una secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y el cribado de clones de mayor afinidad. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de la cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes del dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y cribar en cuanto a una mayor afinidad en varias rondas de recombinación de cadenas como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^9 M.

Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de FGFR3 se conocen en la técnica. La secuencia de ácido nucleico que codifica el FGFR3 se puede diseñar utilizando la secuencia de aminoácidos de la región deseada del FGFR3. Como es bien sabido en la técnica, hay dos isoformas principales de corte y empalme de FGFR3, FGFR3 IIIb y FGFR3 IIIc. Las secuencias de FGFR3 son muy conocidas en la técnica y pueden incluir la secuencia del número de referencia de UniProKB/Swiss-Prot P22607 (FGFR3 IIIc) o P22607_2 (FGFR3 IIIb). Se han identificado mutaciones de FGFR3 y son muy conocidas en la técnica e incluyen las siguientes mutaciones (con referencia a las secuencias que se muestran en el número de referencia de UniProKB/Swiss-Prot) P22607 (FGFR3 IIIc) o P22607_2 (FGFR3 IIIb):

FGFR3-IIIb	FGFR3 IIIc
R248C	R248C
S249C	S249C
G372C	G370C
Y375C	Y373C
G382R	G380R
K652E	K650E

Los ácidos nucleicos que codifican FGFR3 se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos en Engels *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tales como los métodos de triéster, fosfito, de fosforamidita y H-fosfonato. En un aspecto, se utilizan en el diseño del ADN codificante de FGFR3 los codones preferidos por la célula hospedadora de expresión. Como alternativa, el ADN que codifica el FGFR3 se puede aislar de una biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el FGFR3, la molécula de ADN se une operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en donde la secuencia de control es reconocida por una célula hospedadora transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de control y de replicación que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Los vectores adecuados para la expresión en células hospedadoras procariotas y eucariotas se conocen en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como las levaduras o las células obtenidas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica el FGFR3 se une operativamente a una secuencia líder secretora que da como resultado la secreción del producto de expresión por parte de la célula hospedadora en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotina, lamB, GD de herpes, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuada para su uso en el presente documento la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen *et al.*, EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Las células hospedadoras se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente de la presente divulgación y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según corresponda para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora, ya sea que se exprese o no alguna secuencia codificante. Numerosos métodos de transfección son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria generalmente se reconoce cuando se produce dentro de la célula hospedadora cualquier indicio de funcionamiento de este vector. Los métodos para la transfección son muy conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Transformación significa introducir ADN en un organismo para que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para tales células. Los métodos para la transformación son muy conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Las células hospedadoras procariotas utilizadas para producir el FGFR3 se pueden cultivar como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Las células hospedadoras de mamífero utilizadas para producir el FGFR3 se pueden cultivar en diversos medios, lo que es muy conocido en la técnica, y parte de lo cual se describe en el presente documento.

Las células hospedadoras a las que se hace referencia en la presente divulgación abarcan células en cultivo *in vitro* así como células que están dentro de un animal hospedador.

La purificación de FGFR3 se puede lograr utilizando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

- 5 El FGFR3 purificado se puede unir a una matriz adecuada, tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, transportadores neutros e iónicos, y similares, para uso en la separación cromatográfica de afinidad de clones de presentación en fagos. La unión de la proteína FGFR3 a la matriz se puede lograr mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica comúnmente empleada para unir ligandos
- 10 proteicos a matrices de polisacáridos, por ejemplo, de agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del transportador con haluros de cianógeno y el posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias del ligando peptídico a la matriz activada.

- 15 Como alternativa, se puede utilizar FGFR3 para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en separación de células, o conjugarse con biotina para captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para cribar bibliotecas de presentación en fagos.

- 20 Las muestras de la biblioteca de fagos se ponen en contacto con FGFR3 inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competencia con el antígeno FGFR3, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1.000 veces en una sola ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en un cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.
- 25

- 30 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo fago pueden interactuar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante lavados cortos, presentación en fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece el fago que se ha disociado se vuelva a unir. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede favorecerse mediante el uso de lavados prolongados y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).
- 35

- 40 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de afinidades distintas, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para FGFR3. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad descritas anteriormente) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayoría al antígeno, y unos pocos con mayor afinidad. Con FGFR3 limitante, los raros fagos de alta afinidad podrían competir. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con un exceso de FGFR3 biotinilado, pero con el FGFR3 biotinilado a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para FGFR3. Los fagos de unión de alta afinidad pueden capturarse mediante perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Dicha "captura de equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan pequeña como dos veces mayor a partir de un gran exceso de fagos con una afinidad más baja. Las condiciones utilizadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar
- 45
- 50 en función de la cinética de disociación.

- Los clones de FGFR3 pueden seleccionarse por la actividad. En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos para FGFR3 que bloquean la unión entre un receptor FGFR3 y su ligando (tal como FGF1 y/o FGF9). Los clones de Fv correspondientes a tales anticuerpos para FGFR3 pueden seleccionarse (1) aislando clones de FGFR3 de una biblioteca de fagos como se describe anteriormente, y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos haciendo crecer la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando el FGFR3 y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones del fagos anti-FGFR3 al FGFR3 inmovilizado; (4) utilizando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca los determinantes de unión a FGFR3 que se solapan o comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que quedan adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/no bloqueantes deseadas pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.
- 55
- 60

- 65 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales obtenidos de hibridomas o los clones de Fv de presentación en fagos de la divulgación se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de las cadenas

pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de hibridoma o de fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que por lo demás no producen la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la divulgación puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat *et al.*, citado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv obtenido del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como de ser humano) y luego fusionado con el ADN de la región constante de otra especie animal para formar una secuencia (o secuencias) codificantes para una cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbridas", se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En un aspecto preferido, un clon de Fv obtenido de ADN de la variable humana se fusiona con ADN de región constante humana para formar una secuencia (o secuencias) codificante para todas las cadenas pesada y/o ligera humanas, de longitud completa o parcial.

También se puede modificar el ADN que codifica el anticuerpo anti-FGFR3 obtenido de un hibridoma de la divulgación, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena ligera y pesada humanas en lugar de secuencias murinas homólogas obtenidas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento obtenido de un hibridoma o clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniéndose covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es una inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o los anticuerpos obtenidos de un clon de hibridoma de la divulgación.

Fragmentos de anticuerpo

La presente divulgación abarca fragmentos de anticuerpo. En determinadas circunstancias, resulta ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a un acceso mejorado a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo por tanto la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida *in vivo* aumentada que comprende restos epitópicos de unión al receptor de rescate se describen en la patente de EE. UU. N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la materia. En otros aspectos, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185; las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458). Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, son adecuados para la unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La presente divulgación abarca anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácido introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.

Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana más parecida a la de roedor se acepta entonces como armazón humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método utiliza un armazón particular obtenido de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. El mismo armazón se puede usar para varios anticuerpos humanizados distintos (Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol., 151:2623.

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con la conservación de una afinidad alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de determinadas secuencias de inmunoglobulinas candidatas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y muy sustancialmente implicados en la influencia de la unión a antígeno.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-FGFR3 humanos de la divulgación pueden construirse combinando una secuencia (o secuencias) de dominio variable del clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos obtenidas de ser humano con una secuencia (o secuencias) de dominio constante humano conocidas, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales anti-FGFR3 humanos de la divulgación se pueden fabricar mediante el método del hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, en Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1987); y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147:86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la estirpe germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana en tales ratones mutantes de la estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993).

La combinación génica puede utilizarse también para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítipo", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe anteriormente se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/no humana en donde la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo rige (imprime) la elección de la pareja de la cadena humana. Cuando se repite el procedimiento para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos distintos. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por FGFR3 y la otra es por

- 5 cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítomos distintos del FGFR3. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan FGFR3. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a FGFR3 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloides de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo
10 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

- Se conocen en la técnica métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305:
15 537 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos distintas, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker
20 *et al.*, EMBO J., 10: 3655 (1991).

- De acuerdo con un enfoque distinto y más preferido, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que
25 comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos
30 polipeptídicos en aspectos en que relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado rendimientos altos o cuando las relaciones no son de significancia particular.

- En un aspecto preferido de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena
35 ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).
40

- De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre una pareja de moléculas de anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades"
45 compensadoras de tamaño idéntico o similar a la cadena (o cadenas) lateral grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.
50

- Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la materia y se divulgan en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980, junto
55 con una serie de técnicas de reticulación.
60

- Se han descrito también en la bibliografía las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando la unión química. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles próximos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los
65

fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los últimos avances han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado en *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a porciones Fab' de dos anticuerpos distintos mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminoterminal con respecto a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena (o cadenas) polipeptídica comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena (o cadenas) polipeptídica puede comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena (o cadenas) polipeptídica puede comprender: cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Variantes de anticuerpo

En algunos aspectos se contempla la modificación (o modificaciones) de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser conveniente mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo los cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las modificaciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objetivo en el momento en que se fabrica la secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este caso, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (muy preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se perfeccionan a continuación introduciendo variantes adicionales o distintas en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realizó un barrido de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se cribaron en cuanto a la actividad deseada.

Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiloterminales con un intervalo de longitudes de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Normalmente, la glucosilación de polipéptidos está unida a N o unida a O. Unida en N se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, muy frecuentemente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilina.

Se realiza convenientemente adición de sitios de glucosilación en el anticuerpo modificando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos en N). La modificación también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos en O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a la misma. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos modificados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

La variante de glucosilación preferida en el presente documento comprende una región Fc, en donde una reestructura de carbohidrato unida a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen una función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácido en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 con fucosilación deficiente de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con supresión génica, tal como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, células CHO con supresión génica de FUT8 (Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un aminoácido (al menos dos, al menos tres, al menos 4 o más) restos en la molécula de anticuerpo sustituido por un resto distinto. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1, o como se

describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

- 5 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la cadena principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

10

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

15

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

20

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 25 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la variante (o variantes) resultante seleccionada para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar tales variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios)
- 30 se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del M13 empaquetado en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se cribaron a continuación en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de regiones hipervariables candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión al antígeno.
- 35 Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una

vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para el desarrollo posterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser conveniente introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la divulgación, generando así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo la de una cisteína de la bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que, en algunos aspectos, un anticuerpo utilizado en los métodos de la divulgación puede comprender una o más modificaciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características necesarias para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar determinadas modificaciones en la región Fc que darían como resultado en una unión a C1q (es decir, mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificadas, por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 sobre otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión a los FcR mejorada o disminuida.

Véase, también, Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc modificadas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden modificar adicionalmente para que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o distintas. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

Cribado de anticuerpos con las propiedades deseadas

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica (algunos de los cuales se divulgan en el presente documento). En algunos aspectos, los anticuerpos se caracterizan por uno cualquiera o más de la reducción o el bloqueo de la unión de FGF (tal como FGF1 y/o FGF9), la reducción o el bloqueo de la activación de FGFR3, la reducción o el bloqueo de la señalización molecular aguas abajo de FGFR3, la interrupción o el bloqueo de la unión de FGFR3 a un ligando (por ejemplo, FGF1, FGF9), la reducción o el bloqueo de la dimerización de FGFR3, el estímulo de la formación de FGFR3 monomérico, la unión a FGFR3 monomérico, y/o el tratamiento y/o la prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR3 (tal como una expresión y/o actividad aumentadas de FGFR3). En algunos aspectos, los anticuerpos se criban en cuanto a la activación aumentada de FGFR3, la señalización aumentada de moléculas aguas abajo de FGFR3, la actividad apoptótica, la regulación a la baja de FGFR3 y la función efectora (por ejemplo, actividad ADCC).

Los anticuerpos purificados se pueden caracterizar adicionalmente mediante una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitarse a, secuenciación C terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de exclusión por tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos producidos en el presente documento se analizan en cuanto a su actividad biológica. En algunos aspectos, los anticuerpos de la presente divulgación se prueban en cuanto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y que se pueden usar en el presente documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión directa o competitiva utilizando técnicas tales como transferencias tipo western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. La unión a antígeno ilustrativa y otros ensayos se proporcionan a continuación en el apartado de Ejemplos.

Si se desea un anticuerpo anti-FGFR3 que inhiba el crecimiento celular, el anticuerpo candidato puede probarse en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* que midan la inhibición del crecimiento celular. Si se desea un anticuerpo anti-FGFR3 que estimule o no la apoptosis, el anticuerpo candidato puede probarse en ensayos que miden la apoptosis. Los métodos para examinar el crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa, o determinar la apoptosis de una célula cancerosa son bien conocidos en la técnica y algunos se describen y ejemplifican en el presente documento. Los métodos ilustrativos para determinar el crecimiento y/o la proliferación celular y/o la apoptosis incluyen, por ejemplo, ensayo de incorporación de BrdU, MTT, incorporación de [3H]-timidina (por ejemplo, ensayo TopCount (PerkinElmer)), ensayos de viabilidad celular (por ejemplo, CellTiter-Glo (Promega)), ensayos de fragmentación de ADN, ensayos de actividad caspasa, exclusión azul tripano, ensayos de morfología de la cromatina y similares.

En un aspecto, la presente divulgación contempla un anticuerpo que posee funciones efectoras. En determinados aspectos se miden las actividades Fc del anticuerpo. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar de que el anticuerpo carece de actividad de unión a FcγR (careciendo, por tanto, probablemente de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Un ejemplo de ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. También se ejemplifica en el presente documento un ensayo para detectar la actividad de ADCC. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad de CDC, también pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en el apartado de Ejemplos.

Si se desea un anticuerpo anti-FGFR3 que se una a FGFR3 monomérico, el anticuerpo candidato puede probarse en ensayos (tales como ensayos *in vitro*) que miden la unión a FGFR3 monomérico y el estímulo de la formación de FGFR3 monomérico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y algunos ensayos se describen y ejemplifican en el presente documento.

Si se desea un anticuerpo anti-FGFR3 que inhiba la dimerización de FGFR3, el anticuerpo candidato puede probarse en ensayos de dimerización, por ejemplo, como se describe y ejemplifica en el presente documento.

En algunos aspectos, se determina la función agonista de FGFR3 del anticuerpo candidato. Los métodos para evaluar la función o actividad agonista de los anticuerpos FGFR3 se conocen en la técnica y algunos también se describen y ejemplifican en el presente documento.

En algunos aspectos, se determina la capacidad de un anticuerpo FGFR3 para estimular la regulación a la baja del receptor FGFR3, por ejemplo, usando métodos descritos y ejemplificados en el presente documento. En un aspecto, el anticuerpo para FGFR3 se incuba con células de prueba adecuadas, por ejemplo, líneas celulares de cáncer de vejiga (por ejemplo, RT112) y, después de un período de tiempo adecuado, los lisados celulares se recogen y se examinan para determinar los niveles totales de FGFR3. El análisis de FACS también se puede utilizar para examinar los niveles del receptor FGFR3 en la superficie después de la incubación con los anticuerpos para FGFR3 candidatos.

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la divulgación, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta

en un vector replicable para una clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que se utilizará. Generalmente, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas:

i. Construcción de vectores

Las secuencias polinucleotídicas que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo de la divulgación se pueden obtener usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica se pueden usar para el fin de la presente divulgación. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula hospedadora particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de un polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (SUR), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen un replicón y secuencias de control que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que pueden proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido obtenido de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y así proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que puede usar el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen con detalle en Carter *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.648.237.

Además, los vectores de fago que contienen un replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación en conexión con estos hospedadores. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago, tal como λ GEM.TM.-11, para fabricar un vector recombinante que se puede usar para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la divulgación puede comprender dos o más parejas de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada corriente arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de la transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por diversas posibles células hospedadoras. El promotor seleccionado puede unirse operativamente al ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada mediante la eliminación del promotor del ADN fuente a través de la digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia promotora aislada en el vector de la divulgación. Pueden usarse para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes diana tanto la secuencia del promotor nativo como muchos promotores heterólogos. En algunos aspectos se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o fagos conocidos). Sus secuencias nucleotídicas han sido publicadas, lo que permite a un experto en la materia unirlos operativamente a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.*, (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la divulgación, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia

de señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente divulgación debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se reemplaza por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o estables de enterotoxina II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En un aspecto de la divulgación, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la divulgación puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora y, por lo tanto, no precisa la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistron. En ese sentido, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (por ejemplo, cepas de *E. coli* trxB) proporcionan condiciones en el citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de ese modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la divulgación incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En un aspecto, se utilizan células gramnegativas. En un aspecto, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la divulgación. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; depósito de la ATCC n.º 27.325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ*hlyA* (Δ*tonA*) ptr3 lac lq lacL8 Δ*ompT*Δ(nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de EE. UU. n.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden utilizar adecuadamente especies de *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como hospedadoras cuando se utilizan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y se pueden incorporar, convenientemente, inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpos

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota para que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio generalmente se usa para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de pared celular. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Sin embargo, otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la divulgación se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de Luria (LB) más los complementos nutritivos necesarios. En algunos aspectos, los medios también contienen un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el cultivo de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el cultivo de células que expresan un gen de resistencia a ampicilina.

Cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico también puede incluirse en concentraciones apropiadas, introducidos solos o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotritol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente

del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en la expresión del vector de expresión de la divulgación, se induce la expresión de la proteína en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la divulgación, se usan los promotores PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Se pueden usar diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En un aspecto, los polipéptidos expresados de la presente divulgación se secretan y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica la rotura del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, tratamiento con ultrasonidos o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o las células enteras pueden eliminarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse a los medios de cultivo y aislarse allí. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia tipo Western.

En un aspecto de la divulgación, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Diversos procedimientos de fermentación discontinuo a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente la glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas normalmente se inicia después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, estadio en que las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la materia y se describe anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células generalmente se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la divulgación, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de los polipéptidos de anticuerpo secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresen proteínas chaperonas, tales como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.*, (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie *et al.*, (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar para la presente divulgación determinadas cepas hospedadoras deficientes en enzimas proteolíticas. Por ejemplo, las cepas de células hospedadoras pueden modificarse para efectuar una mutación (o mutaciones) genética en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly *et al.*, (1998), citado anteriormente; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En un aspecto, se usan como células hospedadoras en el sistema de expresión de la divulgación cepas de *E. coli* deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

iii. Purificación de anticuerpos

Se pueden emplear métodos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoadfinidad o de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o

sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofluore, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se utiliza Proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmutafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la divulgación. La Proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al.*, (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida en la que se inmutiliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de impedir la adherencia inespecífica de contaminantes.

Como primera etapa de la purificación, la preparación obtenida del cultivo celular, como se ha descrito anteriormente, se aplica sobre la fase sólida inmutilizada con Proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. A continuación, la fase sólida se lava para eliminar los contaminantes unidos de forma no específica a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

b. Generación de anticuerpos utilizando células hospedadoras eucariotas:

Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia de señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para tal región precursora se liga en un marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de la replicación

Generalmente, no se necesita un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) suministran nutrientes cruciales no disponibles en medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a un fármaco y, así, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal uso de selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de la metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, se pueden seleccionar células hospedadoras (en particular, hospedadoras de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador de selección, tal como la aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante el cultivo de células en un medio que contenga un agente de selección para el marcador de selección, tal como un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico del polipéptido de anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases secuencia arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases secuencia arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción del polipéptido de anticuerpo a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como un vector se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Como alternativa, se puede utilizar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous usado como promotor.

(v) Componente de elemento de potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente divulgación por eucariotas superiores a menudo aumenta al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína α e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede experimentar corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en las células hospedadoras eucariotas también contendrán normalmente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el presente documento.

(vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células de eucariotas superiores descritas en el presente documento, que incluyen células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, vacaciones *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para

inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir un anticuerpo de la presente divulgación se pueden cultivar en diversos medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal.

Biochem. 102:255 (1980), Patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; WO 87/00195; o en el Re. de patente de EE. UU. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

(ix) Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, los restos de partículas ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes casual.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Se recomienda la Proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tal como el vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de enfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa (o etapas) de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a una cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Inmunokonjugados

La divulgación también proporciona inmunokonjugados (denominados indistintamente "conjugados de anticuerpo y fármaco" o "ADC"), que comprende cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR3 descritos en el presente documento conjugados con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados de anticuerpo y fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278) permite el suministro dirigido de fracciones farmacológicas a tumores y la acumulación intracelular en los

5 mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados pueden dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (15 de marzo de 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pág. 475-506). De esta forma se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales se han considerado útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) citado anteriormente). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo y toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, 10 toxinas de molécula pequeña tales como geldanamycin (Mandler *et al.* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.*, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.*, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos 15 activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores proteicos.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo y radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa de murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de 20 linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo de ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido mediante un quelante enlazador de tiourea (Wiseman *et al.*, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al.*, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al.*, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.*, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B, la administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), 25 un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por un anticuerpo para CD33 humano unido a la caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; las patentes de EE. UU n.º 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.6937.62; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 unido a través del enlazador disulfuro SPP con la fracción farmacológica maitansinoide, DM1, está 30 avanzando a los ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido a la fracción farmacológica de maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos 35 sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias malignas hemáticas) (Doronina *et al.*, (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento 40 (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no son fragmentos de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcína, crotina, inhibidor de *Saponaia officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Hay diversos radionúclidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente 45 citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bisazido (tal como bis(p-azidobenzoi) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno 50 triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen 60 actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunos aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la 65 divulgación conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de EE. UU. n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE. UU. n.º 4.151.042). Se divulgan el maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos farmacológicos maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en los conjugados de anticuerpo y fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para su preparación por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles a derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de conectores distintos de disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos de fabricación de los mismos y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1). Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células de cáncer de colon cultivadas y mostraba actividad antitumoral en un ensayo *in vivo* de crecimiento tumoral. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los cuales se conjugó un maitansinoide a través de un enlazador disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. Se probó la citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El fármaco conjugado alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, lo que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejorara la citotoxicidad respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.208.020 y en las otras publicaciones de patentes y no patentes mencionadas anteriormente. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y los análogos del maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Se conocen en la técnica muchos grupos de enlace para fabricar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente de EE. UU. n.º 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) y la solicitud de patente de EE. UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterasas, como se divulga en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. Se describen grupos de enlace adicionales y se ilustran en el presente documento.

Pueden fabricarse conjugados del anticuerpo y el maitansinoide usando una diversidad agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar una unión disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, se puede formar una unión éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tenga un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tenga un grupo hidroxilo. En un aspecto preferido el enlazador se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunos aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la divulgación conjugado con dolastatinas o análogos y los derivados peptídicos de dolastatinas, las auristatinas (patentes de EE.UU. N.º 5.635.483 y 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (patente de Estados Unidos n.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit *et al.*, (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La fracción farmacológica de dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) de la fracción farmacológica peptídica (documento WO 02/088172).

Los aspectos ilustrativos de la auristatina incluyen las fracciones farmacológicas de monometilauristatina DE y DF unidas al extremo N, divulgado en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de EE. UU. n.º de serie 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

Normalmente, las fracciones farmacológicas basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de péptidos. Las fracciones farmacológicas de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: las patentes de EE. UU. N.º 5.635.483 y 5.780.588; Pettit *et al.*, (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.*, (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.*, *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al.*, (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat. Biotecnología.* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento de EE. UU. n.º de serie 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004, (que divulga, por ejemplo, enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

iii. Caliqueamicina

En otros aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la divulgación conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE. UU. mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como la QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la divulgación incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida de manera colectiva como el complejo LL-E33288 descrita en las patentes de EE. UU. n.º 5.053.394 y 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE. UU. n.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no son fragmentos de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, sarcina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente divulgación contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, este puede comprender un átomo radiactivo para realizar estudios gammagráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, IRM), tales como, nuevamente, yodo-123, yodo-

131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

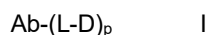
Los marcadores radioactivos u otros pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse a través de un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden fabricarse conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los compuestos de la divulgación contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.). Véanse las páginas 467-498 del 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco

En los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) de la divulgación, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador de fármaco, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de una reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. En el presente documento se describen métodos adicionales para preparar ADC.



El enlazador puede estar compuesto por uno o más componentes enlazadores. Los ejemplos de componentes enlazadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Compuestos de monometilvalina que se pueden conjugar con ligandos", documento de EE. UU. n.º de serie 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

En algunos aspectos, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los enlazadores aminoácidos ilustrativos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Algunos ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Algunos ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes enlazadores aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, cathepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino aminotermiales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de

- ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden fabricarse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más restos de aminoácido cisteína no nativos).
- Los conjugados de anticuerpo y fármaco de la divulgación también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que puede reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o los restos farmacológicos. Las iminas resultantes, como bases de Schiff, pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones de amina estables. En un aspecto, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con bien galactosa oxidasa o metaperyodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otro aspecto, las proteínas que contienen restos de serina o treonina aminoterminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; patente de EE. UU. n.º 5.362.852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con una fracción farmacológica o un nucleófilo enlazador.
- Asimismo, los grupos nucleófilos en una fracción farmacológica incluyen, pero sin limitación: amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, hidracina carboxilato y grupos arilhidracida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.
- Como alternativa, puede fabricarse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.
- En aún otro aspecto, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (como estreptavidina) para su uso en el predireccionamiento a tumores en donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al individuo, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).
- Métodos que utilizan anticuerpos anti-FGFR3**
- La presente divulgación presenta el uso de un anticuerpo para FGFR3 como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso de la actividad de este agente terapéutico. La presente divulgación es particularmente útil en el tratamiento de cánceres de diversos tipos en diversos estadios.
- El término cáncer abarca una colección de trastornos proliferativos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, crecimientos precancerosos, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos permanecen localizados en el sitio de origen y no tienen la capacidad de infiltrar, invadir o producir metástasis en sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos alrededor de ellos. También pueden adquirir la capacidad de desprenderse del lugar original y diseminarse a otras partes del cuerpo (producir metástasis), normalmente a través del torrente sanguíneo o a través del sistema linfático, donde se localizan los ganglios linfáticos. Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido del que provienen; los tumores metastásicos se clasifican por el tipo de tejido del que proceden las células cancerosas. Con el paso del tiempo, las células de un tumor maligno se vuelven más anómalas y se parecen menos a las células normales. Este cambio en el aspecto de las células cancerosas se llama grado del tumor y las células cancerosas se describen como bien diferenciadas (grado bajo), moderadamente diferenciadas, poco diferenciadas o indiferenciadas (grado alto). Las bien diferenciadas son de aspecto relativamente normal y se asemejan a las células normales de las que provienen. Las células indiferenciadas son células que se vuelven tan anómalas que ya no es posible determinar el origen de las células.
- Los sistemas de estadificación del cáncer describen hasta qué punto el cáncer se ha diseminado anatómicamente e intentan poner a los pacientes con pronóstico y tratamiento similares dentro del mismo grupo. Se pueden realizar varias pruebas para ayudar a estadificar el cáncer, incluyendo una biopsia y determinadas pruebas de obtención de imágenes, tales como radiografía de tórax, mamografía, gammagrafía ósea, TAC y RMN. Los análisis de sangre y una evaluación clínica también se utilizan para evaluar la salud global de un paciente y detectar si el cáncer se ha diseminado a determinados órganos.

Para estadificar el cáncer, el American Joint Committee on Cancer primero localiza el cáncer, particularmente los tumores sólidos, en una categoría de letras que usa el sistema de clasificación de TNM. Los cánceres se designan con la letra T (tamaño del tumor), N (ganglios palpables) y/o M (metástasis). T1, T2, T3 y T4 describen el aumento de tamaño de la lesión primaria; N0, N1, N2, N3 indican progresivamente el avance de la implicación de ganglios; y M0 y M1 reflejan la ausencia o presencia de metástasis distante.

En el segundo método de estadificación, también conocido como Agrupamiento de estadios global (en inglés, Overall Stage Grouping) o Estadificación en números romanos (en inglés, Roman Numeral Staging), los cánceres se dividen en los estadios 0 a IV, incorporando el tamaño de las lesiones primarias, así como la presencia de la diseminación a ganglios y de metástasis distante. En este sistema, los casos se agrupan en cuatro estadios indicados por los números romanos I a IV o se clasifican como "recidivantes". Para algunos cánceres, el estadio 0 se denomina "*in situ*" o "Tis", tal como el carcinoma ductal *in situ* o carcinoma lobulillar *in situ* para cánceres de mama. Los adenomas de alto grado se pueden clasificar también como de estadio 0. En general, los cánceres de estadio I son cánceres localizados pequeños que normalmente son curables, mientras que los de estadio IV normalmente representan un cáncer inoperable o metastásico. Los cánceres de estadio II y III normalmente avanzan localmente y/o presentan la implicación de ganglios linfáticos locales. En general, los números de estadios superiores indican una enfermedad más extensa, incluyendo un mayor tamaño del tumor y/o una diseminación del cáncer a ganglios linfáticos cercanos y/u órganos adyacentes al tumor primario. Estos estadios están precisamente definidos, pero la definición es distinta para cada tipo de cáncer y es conocida para el experto en la materia.

Muchos registros del cáncer, tales como el programa Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program de los NCI, utilizan una estadificación resumida. Este sistema se utiliza para todos los tipos de cáncer. Agrupa los casos de cáncer en cinco categorías principales: *In situ* es el cáncer temprano que está presente solo en la capa de las células en las cuales comenzó.

Localizado es el cáncer que se limita al órgano en el cual comenzó, sin pruebas de diseminación.

Regional es el cáncer que se ha diseminado más allá del sitio original (primario) a los ganglios linfáticos cercanos u órganos y tejidos.

Distante es el cáncer que se ha diseminado desde el sitio primario a órganos distantes o ganglios linfáticos distantes.

Desconocido se utiliza para describir los casos para los que no existe suficiente información para indicar el estadio.

Además, es común que el cáncer retorne meses o años después de que el tumor primario se haya eliminado. El cáncer que recidiva después de que todo tumor visible se haya erradicado, se denomina enfermedad recidivante. La enfermedad que recidiva en el área del tumor primario es localmente recidivante y la enfermedad que recidiva como metástasis se denomina recidiva distante.

El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor de partes blandas. Entre los ejemplos de tumores de partes blandas se incluyen la leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T maduros, leucemia linfocítica crónica, leucemia polilinfocítica o tricoleucemia) o linfoma (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T cutáneos o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de los tejidos corporales diferentes de sangre, médula ósea o el sistema linfático. Los tumores sólidos pueden dividirse adicionalmente en los de origen de células epiteliales y los de origen de células no epiteliales. Los ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales incluyen tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario, cabeza y cuello, cavidad bucal, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, útero, órganos genitales masculinos, órganos urinarios, vejiga y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores óseos. Otros ejemplos de tumores se describen en el apartado Definiciones.

En algunos aspectos, el paciente en el presente documento se somete a una prueba diagnóstica, por ejemplo, antes y/o durante y/o después de la terapia. Generalmente, si se realiza una prueba diagnóstica, se puede obtener una muestra de un paciente que necesita terapia. Cuando el sujeto tiene cáncer, la muestra puede ser una muestra de tumor, u otra muestra biológica, tal como un líquido biológico, incluyendo, sin limitación, sangre, orina, saliva, líquido ascítico, o derivados tales como suero sanguíneo y plasma sanguíneo, y similares.

La muestra biológica en el presente documento puede ser una muestra fijada, por ejemplo, fijada con formalina, una muestra incluida en parafina (FFIP) o una muestra congelada.

Diversos métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, pero sin limitación, determinar perfiles de expresión génica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de micromatrices, análisis en serie de la expresión génica (SAGE), MassARRAY, Análisis de expresión génica mediante secuenciación masiva de firma paralela (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente, se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se realiza preferentemente usando la técnica de

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o análisis de micromatrices. Cuando se emplea PCR, una forma preferida de PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En un aspecto, la expresión de uno o más de los genes indicados anteriormente se considera expresión positiva si se encuentra en la mediana o por encima, por ejemplo, en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. El nivel de expresión mediano se puede determinar esencialmente simultáneamente con la medición de la expresión génica, o se puede haber determinado previamente.

Las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica utilizando tejidos fijados e incluidos en parafina como fuente de ARN, incluido el aislamiento de ARNm, la purificación, la extensión de cebadores y la amplificación, se proporcionan en diversos artículos de revista publicados (por ejemplo: Godfrey *et al.* J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un procedimiento representativo comienza con el corte de cortes gruesos de aproximadamente 10 microgramos de muestras de tejido tumoral incluidas en parafina. A continuación, se extrae el ARN y se eliminan las proteínas y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir las etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y el ARN se transcribe a la inversa usando promotores génicos específicos seguido de la PCR. Para finalizar, los datos se analizan para identificar la mejor opción (u opciones) de tratamiento disponibles para el paciente en función del patrón característico de expresión génica identificado en la muestra de tumor examinada.

La detección de la expresión de genes o de proteínas puede determinarse directa o indirectamente.

Se puede determinar la expresión o translocación o amplificación de FGFR3 en el cáncer (directa o indirectamente). Diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico están disponibles para esto. En un aspecto, la sobreexpresión de FGFR3 puede analizarse mediante IHQ. Los cortes de tejido incluidos en parafina de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo de IHQ y se les otorga un criterio de intensidad de tinción de la proteína FGFR3 como sigue:

Puntuación 0, no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos del 10 % de las células tumorales. Puntuación 1+ se detecta una tinción de la membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células solo se tiñen en parte de su membrana. Puntuación 2+, se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10 % de las células tumorales. Puntuación 3+, se observa una tinción de membrana completa de moderada a fuerte en más del 10 % de las células tumorales.

En algunos aspectos, los tumores con puntuaciones de 0 o 1+ en la evaluación de la sobreexpresión de FGFR3 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan FGFR3, mientras que los tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse que sobreexpresan FGFR3.

En algunos aspectos, los tumores que sobreexpresan FGFR3 pueden clasificarse mediante puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de FGFR3 expresadas por célula, y pueden determinarse bioquímicamente:

0 = 0-90 copias/célula,
1+ = al menos aproximadamente 100 copias/célula,
2+ = al menos aproximadamente 1000 copias/célula,
3+ = al menos aproximadamente 10.000 copias/célula.

Como alternativa, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos de FISH en tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina para determinar la presencia y/o el alcance (si lo hay) de la amplificación o translocación de FGFR3 en el tumor.

La activación de FGFR3 puede determinarse directamente (por ejemplo, mediante pruebas de fosfo-ELISA u otros medios para detectar el receptor fosforilado) o indirectamente (por ejemplo, mediante la detección de componentes de la vía de señalización aguas abajo activados, la detección de dímeros de receptor (por ejemplo, homodímeros, heterodímeros), la detección de perfiles de expresión génica, y similares.

De forma similar, pueden detectarse directa o indirectamente FGFR3 constitutivo y/o FGFR3 independiente o dependiente de ligando (por ejemplo, mediante la detección de mutaciones del receptor correlacionadas con la actividad constitutiva, mediante la detección de la amplificación del receptor correlacionada con la actividad constitutiva y similares).

Los métodos para la detección de mutaciones de ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica. A menudo, aunque no necesariamente, se amplifica un ácido nucleico diana en una muestra para proporcionar la cantidad deseada de material para determinar si está presente una mutación. Las técnicas de amplificación son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el producto amplificado puede o no abarcar toda la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés, siempre que el producto amplificado comprenda la posición particular de la secuencia de aminoácidos/ácidos nucleicos donde se sospecha que se encuentra la mutación.

En un ejemplo, la presencia de una mutación se puede determinar poniendo en contacto el ácido nucleico de una

muestra con una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridar específicamente con el ácido nucleico que codifica un ácido nucleico mutado y detectando dicha hibridación. En un aspecto, la sonda está marcada de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo (^3H , ^{32}P , ^{33}P , etc.), un agente fluorescente (rodamina, fluoresceño, etc.) o un agente cromogénico. En algún aspecto, la sonda es un oligómero antisentido, por ejemplo, un APN, morfolino-fosforamidatos, ANB o 2'-alcoxialcoxi. La sonda puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30. En otro aspecto, las sondas de ácido nucleico de la divulgación se proporcionan en un kit para identificar mutaciones de FGFR3 en una muestra, comprendiendo dicho kit un oligonucleótido que se hibrida específicamente con o adyacente a un sitio de mutación en el ácido nucleico que codifica FGFR3. El kit puede comprender además instrucciones para tratar pacientes que tienen tumores que contienen mutaciones de FGFR3 con un antagonista de FGFR3 basándose en el resultado de una prueba de hibridación usando el kit.

Las mutaciones también se pueden detectar comparando la movilidad electroforética de un ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del ácido nucleico correspondiente que codifica el FGFR3 de tipo silvestre. Una diferencia en la movilidad indica la presencia de una mutación en la secuencia de ácido nucleico amplificada. La movilidad electroforética puede determinarse mediante cualquier técnica de separación molecular adecuada, por ejemplo, en un gel de poliacrilamida.

Los ácidos nucleicos también pueden analizarse para la detección de mutaciones utilizando la detección de mutaciones enzimáticas (DME) (Del Tito *et al.*, Clinical Chemistry 44:731-739, 1998). La EMD utiliza el bacteriófago resolvable T₄ endonucleasa VII, que barre a lo largo del ADN bicatenario hasta que detecta y escinde distorsiones estructurales provocadas por desapareamientos de pares de bases resultantes de alteraciones del ácido nucleico, tales como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección de dos fragmentos cortos formados por escisión por resolvable, por ejemplo, por electroforesis en gel, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del método EMD son un único protocolo para identificar mutaciones puntuales, deleciones e inserciones sometido a ensayo directamente a partir de reacciones de amplificación, eliminando la necesidad de la purificación de la muestra, acortando el tiempo de hibridación y aumentando la relación señal-ruido. Se pueden analizar muestras mixtas que contienen un exceso de hasta 20 veces de ácidos nucleicos normales y fragmentos de hasta 4 kb de tamaño. Sin embargo, el barrido de EMD no identifica cambios de bases particulares que se producen en muestras positivas para mutaciones, por lo tanto, a menudo se precisan procedimientos de secuenciación adicionales para identificar la mutación específica si es necesario. La enzima CEL I se puede usar de manera similar a la resolvable T₄ endonucleasa VII, como se demostró en la patente de EE. UU. N.º 5.869.245.

Otro kit simple para detectar mutaciones es una tira reactiva de hibridación inversa similar a Haemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para la detección de mutaciones múltiples en los genes HFE, TFR2 y FPN1, que provocan hemocromatosis. Dicho ensayo se basa en la hibridación específica de secuencias después de la amplificación por PCR. Para ensayos de mutaciones únicas, se puede aplicar un sistema de detección basado en microplacas, mientras que, para los ensayos de mutaciones múltiples, las tiras reactivas se pueden utilizar como "macromatrices". Los kits pueden incluir reactivos listos para usar para la preparación de muestras, la amplificación y la detección de mutaciones. Los protocolos de amplificación múltiple brindan comodidad y permiten analizar muestras con volúmenes muy limitados. Con el sencillo formato StripAssay, las pruebas para veinte y más mutaciones se pueden completar en menos de cinco horas sin un equipo costoso. El ADN se aísla de una muestra y el ácido nucleico diana se amplifica *in vitro* (por ejemplo, por PCR) y se marca con biotina, generalmente en una sola reacción de amplificación ("múltiple"). A continuación, los productos de amplificación se hibridan selectivamente con sondas oligonucleotídicas (de tipo silvestre y específicas de mutantes) inmovilizadas en un soporte sólido, tal como una tira reactiva en la que las sondas se inmovilizan como líneas o bandas paralelas. Los amplicones biotinilados unidos se detectan usando estreptavidina-fosfatasa alcalina y sustratos de color. Dicho ensayo puede detectar todas o cualquier subconjunto de las mutaciones de la divulgación. Con respecto a una banda de sonda de un mutante particular, es posible uno de los tres patrones de señalización: (i) una banda solo para la sonda de tipo silvestre que indica una secuencia de ácido nucleico normal, (ii) bandas para la sonda mutante y de tipo silvestre que indica un genotipo heterocigótico, y (iii) banda solo para la sonda mutante lo que indica un genotipo mutante heterocigótico. Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un método de detección de mutaciones de la divulgación que comprende aislar y/o amplificar una secuencia de ácido nucleico de FGFR3 diana de una muestra, de forma que el producto de amplificación comprenda un ligando, poner en contacto el producto de amplificación con una sonda que comprende una pareja de unión detectable del ligando y la sonda es capaz de hibridar específicamente con una mutación de la divulgación y luego detectar la hibridación de dicha sonda con dicho producto de amplificación. En un aspecto, el ligando es biotina y el compañero de unión comprende avidina o estreptavidina. En un aspecto, el compañero de unión comprende streptavidina-alcalina que es detectable con sustratos de color. En un aspecto, las sondas se inmovilizan, por ejemplo, en una tira reactiva en la que las sondas complementarias con distintas mutaciones están separadas entre sí. Como alternativa, el ácido nucleico amplificado se marca con un radioisótopo, en cuyo caso no es necesario que la sonda comprenda un marcador detectable.

Las modificaciones de un gen de tipo silvestre abarcan todas las formas de mutaciones, tales como inserciones, inversiones, deleciones y/o mutaciones puntuales. En un aspecto, las mutaciones son somáticas. Las mutaciones somáticas son las que se producen solo en determinados tejidos, por ejemplo, en el tejido tumoral, y no se heredan

en la estirpe germinal. Las mutaciones de la estirpe germinal se pueden encontrar en cualquiera de los tejidos del cuerpo.

Se puede obtener una muestra que comprende un ácido nucleico diana mediante métodos bien conocidos en la técnica, y que son apropiados para el tipo y la ubicación particulares del tumor. La biopsia de tejido se usa a menudo para obtener un trozo representativo de tejido tumoral. Como alternativa, las células tumorales se pueden obtener indirectamente en forma de tejidos/líquidos que se sabe o se cree que contienen las células tumorales de interés. Por ejemplo, las muestras de lesiones de cáncer de pulmón se pueden obtener por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillados bronquiales, o de esputo, líquido pleural o sangre. Los genes o productos de genes mutantes pueden detectarse a partir de un tumor o de otras muestras corporales, tales como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas analizadas anteriormente para la detección de genes diana mutantes o productos génicos en muestras de tumores se pueden aplicar a otras muestras corporales. Las células cancerosas se desprenden de los tumores y aparecen en dichas muestras corporales. Mediante el cribado de tales muestras corporales, se puede lograr un diagnóstico temprano simple para enfermedades tales como el cáncer. Además, el progreso de la terapia se puede controlar más fácilmente analizando dichas muestras corporales en cuanto a genes diana mutantes o productos génicos.

Los medios para enriquecer una preparación de tejido en células tumorales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tejido puede aislarse de parafina o por cortes de criostato. Las células cancerosas también se pueden separar de las células normales mediante citometría de flujo o microdissección con captura láser. Estas, así como otras técnicas para separar el tumor de las células normales, son bien conocidos en la técnica. Si el tejido tumoral está muy contaminado con células normales, la detección de mutaciones puede ser más difícil, aunque se conocen técnicas para minimizar la contaminación y/o los resultados positivos/negativos falsos, algunos de los cuales se describen a continuación en el presente documento. Por ejemplo, también se puede evaluar una muestra en cuanto a la presencia de un biomarcador (incluida una mutación) que se sabe que está asociado con una célula tumoral de interés, pero no con una célula normal correspondiente, o viceversa.

La detección de mutaciones puntuales en ácidos nucleicos diana puede lograrse mediante la clonación molecular de los ácidos nucleicos diana y la secuenciación de los ácidos nucleicos utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Como alternativa, pueden usarse técnicas de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias de ácido nucleico diana directamente a partir de una preparación de ADN genómico procedente del tejido tumoral. A continuación, se puede determinar la secuencia de ácido nucleico de las secuencias amplificadas e identificar las mutaciones de las mismas. Las técnicas de amplificación son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa como se describe en Saiki *et al.*, Science 239:487, 1988; las patentes de EE. UU. n.º 4.683.203 y 4.683.195.

Cabe señalar que el diseño y la selección de cebadores apropiados son técnicas bien establecidas en la técnica.

La reacción en cadena de la ligasa, que es conocida en la técnica, también se puede utilizar para amplificar secuencias de ácido nucleico diana. Véase, por ejemplo, Wu *et al.*, Genomics, vol. 4, pág. 560-569 (1989). Además, también se puede utilizar una técnica conocida como PCR específica de alelo. Véase, por ejemplo, Ruano y Kidd, Nucleic Acids Research, vol. 17, pág. 8392, 1989. De acuerdo con esta técnica, se utilizan cebadores que hibridan en sus extremos 3' con una mutación de ácido nucleico diana particular. Si la mutación particular no está presente, no se observa un producto de amplificación. Además, se puede utilizar el sistema de mutación refractario a la amplificación por PCR (ARMS, del inglés *Amplification Refractory Mutation System*), como se divulga en la publicación de solicitud de patente europea N.º 0332435, y en Newton *et al.*, Nucleic Acids Research, vol. 17, p.7, 1989. Las inserciones y deleciones de los genes también pueden detectarse mediante clonación, secuenciación y amplificación. Además, se pueden usar sondas para polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*) para el gen o los genes marcadores circundantes para evaluar la modificación de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. El análisis de polimorfismos de conformación monocatenario (SSCP, del inglés *single stranded conformation polymorphism*) también se puede utilizar para detectar variantes de cambios de bases de un alelo. Véase, por ejemplo, Orita *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, pág. 2766-2770, 1989, y Genomics, vol. 5, pág. 874-879, 1989. También se pueden usar otras técnicas para detectar inserciones y deleciones conocidas en la técnica.

La modificación de los genes de tipo silvestre también puede detectarse basándose en la modificación de un producto de expresión de tipo silvestre del gen. Dichos productos de expresión incluyen tanto el ARNm como el producto proteico. Las mutaciones puntuales pueden detectarse amplificando y secuenciando el ARNm o mediante la clonación molecular del ADNc elaborado a partir del ARNm. La secuencia del ADNc clonado se puede determinar utilizando técnicas de secuenciación de ADN que son muy conocidas en la técnica. El ADNc también se puede secuenciar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los desapareamientos son dúplex de ácidos nucleicos hibridados que no son el 100 % complementarios. La falta de complementariedad total puede deberse a deleciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones de cambio del marco de lectura. La detección de desapareamientos se puede utilizar para detectar mutaciones puntuales en un ácido nucleico diana. Si bien estas técnicas pueden ser menos sensibles que la secuenciación, son más simples de

realizar en un gran número de muestras de tejido. Un ejemplo de una técnica de escisión de desapareamientos es el método de protección de la ARNasa, que se describe en detalle en Winter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82, pág. 7575, 1985, y Meyers *et al.*, Science, vol. 230, pág. 1242, 1985. Por ejemplo, un método de la divulgación puede implicar el uso de una ribosonda marcada que sea complementaria al ácido nucleico diana de tipo silvestre humano.

La ribosonda y el ácido nucleico diana obtenidos de la muestra de tejido se aparean (hibridan) entre sí y, posteriormente, se digieren con la enzima ARNasa A, que es capaz de detectar algunos desapareamientos en una estructura de ARN dúplex. Si la ARNasa A detecta un desapareamiento, escinde en el sitio del desapareamiento. Por tanto, cuando la preparación de ARN apareado se separa en una matriz de un gel electroforético, si la RNasa A ha detectado y escindido un desapareamiento, se verá un producto de ARN que es más pequeño que el ARN dúplex de longitud completa para la ribosonda y el ARNm o el ADN. No es necesario que la ribosonda tenga la longitud total del ARNm o gen del ácido nucleico diana, sino que puede ser una porción del ácido nucleico diana, siempre que abarque la posición sospechosa de estar mutada. Si la ribosonda comprende solo un segmento del ARNm o gen del ácido nucleico diana, puede ser conveniente utilizar varias de estas sondas para escrutar la secuencia de ácido nucleico diana completa en cuanto a desapareamientos, si se desea.

De manera similar, las sondas de ADN se pueden utilizar para detectar desapareamientos, por ejemplo, a través de la escisión enzimática o química. Véase, por ejemplo, Cotton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, 4397, 1988; y Shenk *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 72, pág. 989, 1975. Como alternativa, los desapareamientos se pueden detectar mediante cambios en la movilidad electroforética de los dúplex desapareados con respecto a los dúplex apareados. Véase, por ejemplo, Cariello, Human Genetics, vol. 42, pág. 726, 1988. Con ribosondas o sondas de ADN, el ARNm o el ADN del ácido nucleico diana que podría contener una mutación puede amplificarse antes de la hibridación. Los cambios en el ADN del ácido nucleico diana también se pueden detectar mediante hibridación de tipo southern, especialmente si los cambios son grandes reordenamientos, tales como deleciones e inserciones.

Las secuencias de ADN del ácido nucleico diana que se han amplificado también pueden escrutarse utilizando sondas específicas de alelo. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región del gen del ácido nucleico diana que porta una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede tener una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos, correspondiente a una porción de la secuencia del gen diana. Mediante el uso de un grupo de tales sondas específicas de alelo, los productos de amplificación del ácido nucleico diana pueden escrutarse para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen diana. Se puede realizar la hibridación de sondas específicas de alelo con secuencias del ácido nucleico diana amplificadas, por ejemplo, en un filtro de nylon. La hibridación con una sonda particular en condiciones de hibridación rigurosas indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda específica de alelo.

La modificación de los genes diana de tipo silvestre también se puede detectar mediante el escrutinio en cuanto a una modificación de la proteína de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, para explorar un tejido se pueden utilizar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con el producto génico diana, por ejemplo, un anticuerpo que se sabe que se une a una posición mutada particular del producto génico (proteína). Por ejemplo, un anticuerpo que se use puede ser uno que se una a un exón deleciónado o que se una a un epítipo conformacional que comprende una porción deleciónada de la proteína diana. La falta de antígeno afin indicaría una mutación. También podrían usarse anticuerpos específicos para productos de alelos mutantes para detectar el producto del gen mutante. Los anticuerpos pueden identificarse a partir de bibliotecas de presentación en fagos. Dichos ensayos inmunológicos se pueden realizar en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Estos incluyen transferencias de tipo western, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Puede usarse cualquier medio para detectar una proteína modificada para detectar la modificación de genes diana de tipo silvestre.

Las parejas de cebadores son útiles para la determinación de la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico diana utilizando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Las parejas de cebadores de ADN monocatenarios pueden aparearse con secuencias dentro o alrededor de la secuencia de ácido nucleico diana para cebar la amplificación de la secuencia diana. También se pueden usar cebadores específicos de alelo. Dichos cebadores se aparean solo con una secuencia diana mutante particular y, por tanto, solo amplificarán un producto en presencia de la secuencia diana mutante como molde. Para facilitar la posterior clonación de las secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener secuencias de sitios de enzimas de restricción añadidas a sus extremos. Dichas enzimas y sitios son muy conocidos en la técnica. Los propios cebadores se pueden sintetizar utilizando técnicas que son muy conocidas en la técnica. Generalmente, los cebadores se pueden fabricar usando máquinas de síntesis de oligonucleótidos que están disponibles en el mercado. El diseño de cebadores particulares está dentro de los conocimientos de la técnica.

Las sondas de ácido nucleico son útiles para una serie de fines. Se pueden usar en la hibridación de tipo southern con el ADN genómico y en el método de protección de ARNasa para detectar mutaciones puntuales ya analizadas anteriormente. Las sondas se pueden utilizar para detectar productos de amplificación de ácidos nucleicos diana. También se pueden usar para detectar desapareamientos con el gen de tipo silvestre o el ARNm usando otras técnicas. Los desapareamientos se pueden detectar usando enzimas (por ejemplo, nucleasa S1), productos químicos (por ejemplo, hidroxilamina o tetróxido de osmio y piperidina) o cambios en la movilidad electroforética de híbridos desapareados en comparación con híbridos totalmente apareados. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Véase Novack *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, pág. 586, 1986. Generalmente, las sondas son

complementarias con secuencias fuera del dominio de cinasa. Puede usarse una batería completa de sondas de ácido nucleico para componer un kit para detectar mutaciones en ácidos nucleicos diana. El kit permite la hibridación con una gran región de una secuencia diana de interés. Las sondas pueden solaparse entre sí o ser contiguas.

- 5 Si se usa una ribosonda para detectar desapareamientos con ARNm, generalmente es complementaria al ARNm del gen diana. La ribosonda, por tanto, es una sonda antisentido en el sentido de que no codifica el producto génico correspondiente porque es complementaria a la hebra sentido. La ribosonda generalmente se macará con un material radioactivo, colorimétrico o fluorométrico, esto puede conseguirse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Si la ribosonda se usa para detectar desapareamientos con el ADN, puede ser de cualquier polaridad, sentido o
10 antisentido. De forma similar, también se pueden sondas de ADN usar para detectar desapareamientos.

- En algunos casos, el cáncer sobreexpresa o no FGFR3. La sobreexpresión del receptor puede determinarse en un ensayo diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína receptora presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHQ). Como alternativa, o adicionalmente, se
15 pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el receptor en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de tipo southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Además de los anteriores ensayos, están disponibles para el experto diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un
20 marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo, mediante exploración externa por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Agentes quimioterapéuticos

- 25 La terapia de combinación de la divulgación puede comprender además un agente (o agentes) quimioterapéutico. La administración combinada incluye la coadministración conjunta o simultánea, utilizando formulaciones distintas o una única formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde, preferentemente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas de forma
30 simultánea.

- El agente quimioterapéutico, si se administra, habitualmente se administra a dosificaciones conocidas para ello, u opcionalmente se reduce debido a la acción combinada de los fármacos o a los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. La preparación y las pautas posológicas
35 para tales agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o como se determine de forma empírica por el experto en la materia.

Se divulgan en el presente documento diversos agentes quimioterapéuticos que pueden combinarse.

- 40 En algunos aspectos, los agentes quimioterapéuticos a combinar se seleccionan del grupo que consiste en lenalidomida (REVLIMID), inhibidores del proteosoma (tales como bortezomib (VELCADE) y PS342), un bora taxoide (incluidos docetaxel y paclitaxel), vinca (tal como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tal como carboplatino o cisplatino), inhibidor de aromataasa (tal como letrozol, anastrozol o exemestano), anti-estrógeno (por ejemplo, fulvestrant o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, pemetrexed, metotrexato, doxorubicina
45 liposómica, doxorubicina liposómica pegilada, capecitabina, gemcitabina, meltalina, doxorubicina, vincristina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib) o esteroide (por ejemplo, dexametasona y prednisona). En algunos aspectos (por ejemplo, aspectos que implican el tratamiento del mieloma múltiple t(4;14)+, dexametasona y lenalidomida, o dexametasona, o bortezomib, o vincristina, doxorubicina y dexametasona, o talidomida y dexametasona, o doxorubicina liposómica, vincristina y dexametasona, o lenalidomida y dexametasona, o bortezomib
50 y dexametasona, o bortezomib, se combinan doxorubicina y dexametasona. En algunos aspectos (por ejemplo, aspectos que implican al cáncer de vejiga), gemcitabina y cisplatino, o un taxano (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), o pemetrexed, o metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino, o carboplatino, o mitomicina C en combinación con 5-Fluorouracilo, o cisplatino, o se combinan cisplatino y 5-Fluorouracilo.

55 Formulaciones, dosificaciones y administración

- Los agentes terapéuticos utilizados en la divulgación se formularán, dosificarán y administrarán de una forma acorde con un correcto ejercicio de la medicina. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el sujeto particular que se está tratando, la situación clínica del paciente individual, la causa del
60 trastorno, al sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, la interacción fármaco-fármaco de los agentes a combinar, y otros factores conocidos por los médicos.

- Las formulaciones terapéuticas se preparan utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica, mezclando el principio activo que tiene el grado de pureza deseado con transportadores opcionales, excipientes o estabilizantes
65 fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los transportadores aceptables, incluyen solución salina o tampones tales como

fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro de sodio, y preferentemente en concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la divulgación pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la concentración de conservante varía del 0,1 y el 2,0 %, normalmente p/p. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en la técnica farmacéutica. El alcohol bencílico, el fenol, el m-cresol, el metilparabeno y el propilparabeno son conservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones de la divulgación pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable en una concentración del 0,005 al 0,02 %.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y una microcápsula de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etilvinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden desarrollar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Los agentes terapéuticos de la divulgación se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa en embolada o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracefalloarraquídea, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. También se puede utilizar para aplicaciones terapéuticas una estrategia *ex vivo*. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de FGFR3. A continuación, las células transfectadas o transducidas se devuelven al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de una amplia gama de tipos que incluyen, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista de FGFR3 es un anticuerpo, el anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, muy preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es corta o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista de FGFR3 se administra localmente, por ejemplo, por inyección directa, cuando el trastorno o la localización del tumor lo permitan, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El antagonista de FGFR3 también puede suministrarse sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o a un lecho tumoral después de la extirpación quirúrgica del tumor, para prevenir o reducir la

recidiva local o la metástasis.

La administración de los agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente durante un período de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas, dependiendo de la combinación seleccionada). Una terapia destinados pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de manera secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento distinto, así como la administración de estos agentes terapéuticos o al menos dos de los agentes terapéuticos, de manera sustancialmente simultánea.

El agente terapéutico puede administrarse por la misma vía o por vías distintas. Por ejemplo, el anticuerpo anti-FGFR3 de la combinación puede administrarse por inyección intravenosa mientras que un agente quimioterapéutico de la combinación puede administrarse por vía oral. Como alternativa, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o ambos agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección intravenosa, dependiendo de los agentes terapéuticos específicos. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos también varía dependiendo de los agentes específicos.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de cada agente terapéutico es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se trata el cáncer, según se mida mediante los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas.

La presente solicitud contempla la administración del anticuerpo para FGFR3 mediante terapia génica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 en referencia al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la divulgación se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un rótulo o un prospecto en el envase sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí sola o combinada con otra composición (o composiciones), es eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la enfermedad, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo en la composición es un anticuerpo de la invención. El rótulo o prospecto de envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como el cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende un anticuerpo de la divulgación y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en donde la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación en este aspecto de la divulgación puede comprender además un prospecto de envase que indique que la primera y la segunda composiciones de anticuerpos pueden utilizarse para tratar una afección particular, por ejemplo, el cáncer. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la divulgación. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversos otros aspectos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

Materiales y métodos

Líneas celulares y cultivo celular

La línea celular RT4 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las líneas celulares RT112, OPM2 y Ba/F3 se adquirieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Alemania). La línea celular de mieloma múltiple KMS11 fue proporcionada amablemente por el Dr. Takemi Otsuki de la Facultad de Medicina de Kawasaki (Japón). La línea celular de cáncer de vejiga TCC-97-7 fue un obsequio generoso de la Dra. Margaret Knowles del Hospital Universitario de St. James (Leeds, RU). La línea celular UMUC-14 se obtuvo del Dr. H.B. Grossman (actualmente en el Texas M.D. Anderson Cancer Center, TX). Las células se mantuvieron con medio RPMI complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Sigma), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y L-glutamina en condiciones de CO₂ al 5 % a 37 °C.

Estudios de dimerización de FGFR3^{S249C}

Las células UMUC-14 se cultivaron en medio sin cisteína, se trataron con R3Mab o DTNB durante 3 horas y los lisados celulares se sometieron a análisis de inmunotransferencia en condiciones reductoras o no reductoras. Para los estudios de dimerización *in vitro*, se clonó FGFR3-IIIb^{S249C} (restos 143-374) en el vector pAcGP67A y se expresó en células T.ni Pro. La proteína recombinante se purificó a través de una columna de Ni-NTA seguido de una columna Superdex S200. FGFR3^{S249C} dimerico se eluyó en Tris 25 mM (pH 7,5) y NaCl 300 mM. Se incubó R3Mab (1 µM) con dímico de FGFR3^{S249C} (0,1 µM) a 37 °C en las siguientes condiciones: KH₂PO₄ 100 mM (pH 7,5), DTT 25 µM, EDTA 1 mM y BSA 0,75 mg/ml. Se tomaron alícuotas de la reacción en los puntos de tiempo indicados y la reacción se detuvo añadiendo tampón de muestra sin β-mercaptoetanol. El dímero-monómero se analizó mediante inmunotransferencia.

Estudios de xenoinjerto

Todos los estudios fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de Genentech. Se adquirieron ratones hembra nu/nu o ratones CB17 con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), de 6-8 semanas de edad en el Laboratorio Charles River (Hollister, CA). Se obtuvieron ratones lampiños atímicos hembra del National Cancer Institute-Frederick Cancer Center. Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Se implantaron células estables para ARNhc de RT112 (7 x10⁶), células RT112 (7 x10⁶), Ba/F3-FGFR3^{S249C} (5 x10⁶), OPM2 (15 x10⁶) o KMS11 (20 x10⁶) por vía subcutánea en el flanco de los ratones en un volumen de 0,2 ml en HBSS/matrigel (1:1 v/v, BD Biosciences). Las células UMUC-14 (5 x10⁶) se implantaron sin matrigel. Los tumores se midieron dos veces por semana con un calibrador y el volumen tumoral se calculó con la fórmula: V=0,5 a x b², donde a y b son el largo y la anchura del tumor, respectivamente. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó los 150-200 mm³, los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 10 y se trataron dos veces por semana con una inyección intraperitoneal (i.p.) de R3Mab (0,3-50 mg/kg) o una IgG1 humana de control diluida en HBSS. Los animales de control recibieron vehículo (HBSS) solo.

Datos estadísticos

Los datos agrupados se expresan como media +/- ETM. Se utilizaron pruebas de la t de Student para datos independientes (bilateral) para la comparación entre dos grupos. Un valor de p<0,05 se consideró estadísticamente significativo en todos los experimentos.

Generación de células estables para ARNhc de FGFR3

Se clonaron tres ARNhc de FGFR3 independientes en el vector pHUSH como se describe (1). La secuencia de los ARNhc de FGFR3 utilizados en los estudios es la siguiente: ARNhc2: 5'GATCCCCGCATCAAGCTGCGGCATCATTCAAGAGATGATGCCGCAGCTTGATGCTTTTTTGGAAA (SEQ ID NO: 192); ARNhc4: 5'-GATCCCCTGCACAACCTCGACTACTATTCAAGAGATAGTAGTCGAGGTTGTGCATTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO: 193); ARNhc6: 5'-GATCCCCAACCTCGACTACTACAAGATTCAAGAGATCTTGTAGTAGTCGAGGTTTTTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO: 194). Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación. El ARNhc de control de EGFP se describió en el estudio anterior de los inventores (50). El retrovirus que contiene ARNhc se produjo mediante la cotransfección de células de empaquetamiento GP2-293 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) con construcciones de VSV-G (Clontech Laboratories) y de pHUSH-ARNhc de FGFR3, y los sobrenadantes víricos se recogieron 72 horas después de la transfección y se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación para el experimento de transducción.

Las células RT112 se mantuvieron en medio RPMI 1640 que contenía SFB sin tetraciclina (Clontech Laboratories) y se transdujeron con sobrenadante retroviral en presencia de polibreno 4 µg/ml. 72 horas después de la infección, se añadió puromicina 2 µg/ml (Clontech Laboratories) al medio para seleccionar clones estables que expresaran ARNhc. Se aislaron células estables, se trataron con doxiciclina 0,1 o 1 µg/ml (Clontech Laboratories) durante 4 días y se evaluó la atenuación génica de la expresión de la proteína FGFR3 mediante análisis de transferencia tipo western. Se realizaron análisis del ciclo celular como se describe (51).

Selección de anticuerpos de fago específicos para FGFR3

Se usaron para la selección bibliotecas de anticuerpos de fagos humanos con diversidades sintéticas en las regiones determinantes de complementariedad (H1, H2, H3, L3), que imitan la diversidad natural del repertorio de IgG humana. Los fragmentos Fab se presentaron bivalentemente en la superficie de las partículas del bacteriófago M13 (52). Se usaron como antígenos IgD2-D3 etiquetados con His de FGFR3-IIIb y IIIc humanos. Se recubrieron inmunoplaacas MaxiSorp (Nunc) de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con proteína FGFR3-IIIb-His o proteína FGFR3-IIIC-His (10 µg/ml) y se bloquearon durante 1 hora con tampón PBST (PBS con Tween 20 al 0,05 %) complementado con BSA al 1 %. Se añadieron las bibliotecas de fagos de anticuerpos y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron con tampón PBST y los fagos unidos se eluyeron con HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante

30 minutos y se neutralizaron con un volumen igual de Tris base 1 M. Los fagos recuperados se amplificaron en células *E. coli* XL-1 blue. Durante las siguientes rondas de selección, el tiempo de incubación de los anticuerpos de fagos se redujo a 2 horas y la rigurosidad del lavado de las placas se aumentó gradualmente (53). Se identificaron anticuerpos de fago exclusivos y específicos que se unen a las isoformas IIIb y IIIc de FGFR3 mediante ELISA de fagos y secuenciación de ADN. De 400 clones cribados, se seleccionaron cuatro para reformatear a IgG de longitud completa mediante la clonación de regiones VL y VH de clones individuales en los vectores LPG3 y LPG4, respectivamente, se expresaron transitoriamente en células de mamífero y se purificaron con columnas de proteína A (54). El clon 184.6 se seleccionó por maduración de la afinidad.

Para la maduración de la afinidad, el fagémido que presentaba un Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M13 (52) sirvió como molde de la biblioteca para injertar dominios variables de cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH) del fago Ab. Los codones de terminación se incorporaron en CDR-L3. Se adoptó una estrategia de aleatorización suave para la maduración de la afinidad como se describe (53). Para la aleatorización se seleccionaron dos combinaciones distintas de bucles de CDR H1/H2/L3, H3/L3 o L1/L2/L3. Para seleccionar clones con afinidad madurada, se separaron las bibliotecas de fagos frente a la proteína FGFR3 IIIb o IIIc-His, se sometieron a separación de placa para la primera ronda, seguido de cuatro rondas de separación de fase en solución como se describe (52). Después de cinco rondas de selección, se usó un ELISA de fagos competitivo de un solo punto de alto rendimiento para cribar rápidamente clones de alta afinidad como se describe (55). Se eligieron para una caracterización adicional clones con una relación baja de la absorbancia a 450 nm en presencia de FGFR3-His 10 nM con respecto a la de en ausencia de FGFR3-His.

Los clones 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 y 184.6.92 redujeron significativamente la viabilidad de Ba/F3-FGFR3-IIIb, Las líneas celulares Ba/F3-FGFR3-IIIc y Ba/F3-FGFR3-S249C y el clon 184.6.52 redujeron significativamente la viabilidad de la línea celular Ba/F3-FGFR3-S249C. El aumento de la actividad inhibidora varió de aproximadamente 50 veces (clon 184.6.52) a aproximadamente 100 veces (clones 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 y 184.6.92) mayor que el clon parental 184.6, dependiendo de la línea celular sometida a ensayo. La cinética de unión de los clones 184.6.1, 184.6.58 y 184.6.62 a FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc se determinó de la siguiente manera utilizando BIAcore:

	KD (M) de FGFR3-IIIb	KD (M) de FGFR3-IIIc
184,6	3,80E-08	1,10E-07
184.6.1	2,64E-10	1,44E-09
184,6.58	1,90E-10	8,80E-10
184.6.62	1,20E-10	2,24E-09

Los clones 184.6.1, 184.6.58 y 184.6.62 también mostraron una inhibición mejorada de la señalización aguas abajo de FGFR3 en las células Ba/F3-FGFR3, células RT112 y células OPM2.

Se seleccionó el clon 184.6.1. Una modificación de secuencia, N54S, se introdujo en HVR H2 en el resto 54, para mejorar la capacidad de fabricación, creando el clon 184.6.1N54S. Los clones 184.6.1 y 184.6.1N54S presentaron una cinética de unión comparable (medida en ensayos de Biacore) y una actividad comparable en el ensayo de viabilidad de células Ba/F3. Se generaron variantes HVR H2 adicionales: N54S se introdujo en el clon 184.6.58 y N54G, N54A o N54Q se introdujeron en los clones 184.6.1 y 184.6.58. Estos clones mostraron una actividad comparable en el ensayo de viabilidad de células Ba/F3 a los clones parentales 184.6.1 o 184.6.58.

Otra modificación de secuencia, D30E, se introdujo en HVR L1 del clon 184.6.1N54S, creando el clon 184.6.1NSD30E. El clon 184.6.1NSD30E y el clon 184.6.1N54S mostraron una cinética de unión y una actividad comparables en el ensayo de viabilidad de células BA/F3 con los clones parentales 184.6.1 o 184.6.58.

Como se usa en el presente documento, "R3 Mab" se refiere a los clones de anticuerpos anti-FGFR3 184.6.1N54S, 184.6.1 o 184.6. El clon 184.6.1N54S se usó en figuras y experimentos que hacen referencia a "R3Mab", excepto en los experimentos que conducen a los resultados que se muestran en las siguientes figuras (para los cuales el anticuerpo utilizado se muestra entre paréntesis): Figuras 9B (clon 184.6.1), 10 (clon 184.6), 11A y B (clon 184.6), 13 (clon 184.6.1), 14A (clon 184.6.1), 14B, G y H (clon 184.6), 19 (clon 184.6.1) y 22B y C (clon 184.6.1).

Análisis de BIAcore/resonancia de plasmón superficial (RPS) para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos

Las afinidades de unión de R3Mab a FGFR3 se midieron mediante Biacore/RPS usando un instrumento Biacore™-3000 como se describe (52) con las siguientes modificaciones. R3Mab se recubrió directamente en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 400 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie con factor dos de proteína FGFR3-IIIb o IIIc-His (comenzando en 67 nM) en tampón PBST a 25 °C con un caudal de 30 µl/minuto. Las tasas de asociación (Kon, por mol/s) y las tasas de disociación (Koff, por s) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno (programa informático BIAcore Evaluation

versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (K_d , por mol) se calculó como la relación de k_{off}/k_{on} .

Las afinidades de unión de los anticuerpos de hibridoma de ratón a FGFR3 se midieron mediante Biacore/SRP como sigue. FGFR3-IIIb o IIIc humanos se acoplaron a tres celdas de flujo (CF) distintas, CF2, CF3 y CF4, de un chip sensor CM5 BIACORETM para lograr la unidad de respuesta (UR) de aproximadamente 50 UR. La inmovilización se logró mediante acoplamiento aleatorio a través de grupos amino utilizando un protocolo proporcionado por el fabricante. Se registraron sensogramas para la unión de IgG murinas anti-FGFR3 obtenidas de hibridoma o el fragmento Fab a estas superficies a 25 °C mediante la inyección de una serie de soluciones que variaban de 250 nM a 0,48 nM en incrementos de 2 veces a un caudal de 30 µl/ mín. Entre cada inyección, se utilizó Glicina-HCl 10 mM pH 1,7 como tampón para regenerar el chip sensor. La señal de la celda de referencia (CF1) se restó del sensograma observado en CF2, CF3 y CF4. Las constantes cinéticas se calcularon mediante ajuste de regresión no lineal de los datos de acuerdo con un modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando el programa informático de evaluación BIAcore (versión 3.2) suministrado por el fabricante.

Estudios de unión por ELISA

Los ADNc que codifican los dominios extracelulares (DEC) de FGFR1-IIIb, IIIc, FGFR2-IIIb y IIIc, FGFR3-IIIb y IIIc, y FGFR4 humanos se clonaron en un vector basado en pRK para generar proteínas quiméricas FGFR-Fc humano. Las proteínas recombinantes se produjeron mediante la transfección transitoria de células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Para probar la unión de los anticuerpos a FGFR humanos, se recubrieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) durante una noche a 4 °C con 50 µl de 2 µg/ml de proteínas quiméricas DEC de FGFR-Fc humano. Después de bloquear con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/BSA al 3 %, se añadió anticuerpo para FGFR3 y se incubó a TA durante 2 horas. El anticuerpo FGFR3 unido específicamente se detectó utilizando un Fab anti-humano conjugado con HRP y el sustrato colorigénico de peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD).

Para probar el efecto de los anticuerpos contra FGFR3 sobre la interacción FGF/FGFR3, se capturaron las proteínas quiméricas FGFR3-Fc en una placa Maxisorp recubierta con anticuerpo específico para el fragmento Fcy de anti-inmunoglobulina humana (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Después del lavado, se añadió una cantidad creciente de anticuerpo para FGFR3 a la placa y se incubó durante 30 minutos. Luego, se añadieron FGF1 o FGF9 y heparina para la incubación a TA durante 2 horas. Las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo policlonal específico para FGF1 biotinilado (BAF232) o anticuerpo FGF9 biotinilado (BAF273, R&D Systems), seguido de detección con estreptavidina-HRP y TMB.

Generación de células estables Ba/F3-FGFR3

El ADNc que codifica FGFR3 IIIb o IIIc humano de longitud completa se clonó en el vector pQCXIP (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) para generar pQCXIP-FGFR3-IIIb o IIIc. Se introdujeron en el ADNc mutaciones específicas, es decir, R248C, S249C, G372C, Y375C y K652E, a través de QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA). Para generar células estables Ba/F3 que expresen FGFR3 de tipo silvestre o mutante, varias construcciones de pQCXIP-FGFR3 se cotransfectaron en células de empaquetamiento GP2-293 con el plásmido VSV-G (Clontech Laboratories). Después de la selección con puomicina 2 µg/ml durante dos semanas, las células que expresaban FGFR3 de tipo silvestre o mutante se tiñeron con mAb anti-FGFR3 humano conjugado con ficoeritrina (FAB766P, R&D Systems) y se seleccionaron mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para ensayos funcionales. Para el ensayo de proliferación celular en placa de microtitulación de 96 pocillos, se utilizó la siguiente densidad celular: Para células que expresan FGFR3-IIIb de tipo silvestre y FGFR3-K652E: 5.000 células/pocillo; para el resto: 10.000 células/pocillo. Las células se sembraron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10 %, FGF1 10 ng/ml más heparina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se añadió R3Mab a la concentración indicada y se añadieron anticuerpos para FGFR3 de hibridoma de ratón a 2000 a 0,49 ng/ml (en diluciones en serie con factor cuatro) en el experimento de FGFR3-IIIb y de 5000 a 1,2 ng/ml (en diluciones en serie con factor cuatro) en el experimento de FGFR3-IIIc. Después de la incubación durante 72 horas, se midió la viabilidad celular mediante CellTiter Glo (Promega, Madison, WI).

Ensayo de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación para las células RT112, RT4 y TCC-97-7, se sembraron 3000 células/pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se permitió que se adhirieran durante una noche. A continuación, el medio se sustituyó por medio con bajo contenido de suero (SFB al 0,5 %) con control o R3Mab en las concentraciones indicadas. Después de 4 días de incubación, se añadió a cada pocillo 1 µCi de [Metil-³H] timidina (PerkinElmer, Waltham, MA) y se incubó durante 16 horas más. Las células se transfirieron a UniFilters usando el Packard Filtermate Harvester, y la [³H]-timidina incorporada en el ADN genómico de las células en crecimiento se midió utilizando TopCount (PerkinElmer). En algunos casos, la viabilidad celular se evaluó con CellTiter-Glo (Promega) después de la incubación con anticuerpos durante 4 días. Los valores se presentan como medias +/- DT de cuadruplicados.

Ensayo de crecimiento clonal

El efecto de R3Mab sobre la clonogenicidad celular se evaluó siguiendo un protocolo descrito previamente (50). En resumen, se sembraron 400 células UMUC-14 en una placa de 6 pocillos en medio DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % para permitir la adhesión durante una noche. Luego, se añadió R3Mab o anticuerpo de control diluidos en medio con BSA al 0,1 % hasta una concentración final de 10 ug/ml. Se utilizó un volumen igual de medio con BSA al 0,1 % solo (simulado) como otro control. Las células se incubaron durante aproximadamente 12 días hasta que las células de los grupos de control formaron colonias suficientemente grandes. Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,5 % y el número y el tamaño de las colonias se cuantificaron mediante GelCount (Oxford, RU). El número de colonias mayores de 120 µm de diámetro se presentó como la media +/- ETM (n=12).

10 Análisis por inmunoprecipitación e inmunotransferencia

Para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre la señalización de FGFR3, las células se privaron de nutrientes en medio sin suero durante la noche anterior al comienzo del tratamiento. Las células se incubaron con anticuerpos diluidos en BSA al 0,1 % (p/v), medio RPMI 1640, o con medio con BSA al 0,1 % solo (simulado). Después de 3 horas a 37 °C, se añadieron FGF1 (concentración final de 15 ng/ml) y heparina (concentración final de 5-10 µg/ml) a la mitad de las muestras. Como controles, se añadió un volumen similar de heparina sola a la otra mitad de las muestras. La incubación se continuó durante 10 min. Los sobrenadantes se retiraron por aspiración y las células se lavaron con PBS enfriado en hielo, luego se lisaron en tampón RIPA (Upstate, Charlottesville, VA) complementado con ortovanadato de sodio 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas completo (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Los lisados se clarificaron de materiales insolubles por centrifugación.

Se inmunoprecipitó FGFR3 utilizando un anticuerpo policlonal de conejo (sc-123, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil de sodio (SDS-PAGE) y transferencia de tipo western. El FGFR3 fosforilado se evaluó con un anticuerpo monoclonal contra fosfo-tirosina (4G10, Upstate). El FGFR3 total se exploró con un anticuerpo monoclonal contra FGFR3 (sc-13121, Santa Cruz Biotechnology). La fosforilación y la activación de la ruta de señalización de FGFR3 se exploraron utilizando los siguientes anticuerpos: anti-FGFR^{Y653/654}, anti-FRS2α^{Y196}, anti-fosfo-p44/42 MAPK^{T202/Y204}, anti-p44/42 MAPK total y anti-AKT^{S473} se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA); y anti-FRS2α total (sc-8318) se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Las transferencias se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Mapeo epitópico de anticuerpos

Para determinar el epítipo de R3Mab, 13 péptidos solapantes, cada uno de 15 aminoácidos de longitud, se sintetizaron para cubrir el dominio extracelular de FGFR3 humano del resto 138 al 310. Los péptidos se biotinilaron en el extremo C y se capturaron en placas de estreptavidina (Pierce, Rockford, IL) durante una noche. Después de bloquear con PBS/BSA al 3 %, las placas se incubaron con R3Mab y se detectaron usando un anti-IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) y el sustrato colorigénico de peroxidasa TMB (KPL, Gaithersburg, MD).

Los anticuerpos de hibridoma de ratón anti-FGFR3 humano 1G6, 6G1 y 15B2 se analizaron en un ensayo ELISA para identificar sus epítipos de unión. 1G6, 6G1 y 15B2 se unen a IgD2-IgD3 de FGFR3 humano (isoformas tanto IIIb como IIIc), mientras que 5B8 solo se une a IgD2-IgD3 de FGFR3-IIIb humano. En un ensayo de competición, 1G6, 6G1 y 15B2 compitieron entre sí para unirse a FGFR3 humano, lo que sugiere que 1G6, 6G1 y 15B2 tienen epítipos solapantes. Ninguno de los anticuerpos de hibridoma compitió con el anticuerpo de fago 184.6, lo que sugiere que los anticuerpos de hibridoma tienen un epítipo (o epítipos) distinto de 184.6.

Preparación y clonación molecular de los anticuerpos anti-FGFR3 de ratón 1G6, 6G1 y 15B2

Se inmunizaron ratones BALB/c 12 veces con 2,0 µg de FGFR3-IIIb (quimera rhFGFR3 (IIIb)/Fc, de R&D Systems, n.º de catálogo 1264-FR, lote n.º CYH025011, o con 2,0 µg de FGFR3-IIIc (quimera rhFGFR3 (IIIc)/Fc, de R&D Systems, n.º de catálogo 766-FR, lote n.º CWZ055041, resuspendidos en adyuvante de monofosforil lípido A/dicorinomicolato de trehalosa (Corixa, Hamilton, MT) en cada almohadilla de la pata trasera dos veces por semana. Tres días después del refuerzo final, los ganglios linfáticos poplíteos se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag.U.1, mediante electrofusión (Hybrimmune, Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, Maryland). Las células de hibridoma fusionadas se seleccionaron a partir de los ganglios poplíteos no fusionados o de las células de mieloma usando selección de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) en Medio D del kit de selección de hibridomas ClonaCell® (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá). Los sobrenadantes de cultivo se escrutaron inicialmente en cuanto a su capacidad para unirse a FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc por ELISA, y los hibridomas de interés se escrutaron posteriormente en cuanto a su capacidad de teñir por FACS células Ba/F transfectedas con FGFR3-IIIb y Ba/F de control, así como la actividad bloqueante de anticuerpos. A continuación, los hibridomas seleccionados se clonaron mediante dilución limitante.

El ARN total se extrajo de las células de hibridoma que producían los anticuerpos monoclonales de ratón anti-FGFRIII humano 1G6 y 15B2, usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Alemania). Los dominios variable ligero (VL) y variable pesado (VH) se amplificaron mediante RT-PCR con los siguientes cebadores degenerados:

1G6:

Directo de cadena ligera (LC): 5'-GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCWGC-3' (SEQ ID NO: 195)

5 Directo de cadena pesada (HC): 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCAIRCARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 196)

6G1:

10 Directo de cadena ligera (LC): 5'-GTCAGATATCGTGCTGACMCARTCTCC-3' (SEQ ID NO: 197)

Directo de cadena pesada (HC): 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCAIRCARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 198)

15 15B2:

Directo de cadena ligera (LC): 5'-GTACGATATCCAGATGACMCARTCTCC-3' (SEQ ID NO: 199)

20 Directo de cadena pesada (HC): 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCAIRCARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 200)

El cebador inverso de cadena ligera y cadena pesada para los tres clones es el siguiente:

Inverso cadena ligera: 5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (SEQ ID NO: 201)

25 Inverso cadena pesada: 5'-ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (SEQ ID NO: 202).

30 Los cebadores directos eran específicos para la secuencia de aminoácidos aminoterminal de la región VL y VH. Los cebadores inversos para LC y HC se diseñaron para aparearse con una región en el dominio ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1), respectivamente, que están altamente conservados entre especies.

35 El VL amplificado se clonó en un vector de expresión de células de mamífero pRK (Shields *et al.*, (2000) J. Biol. Chem. 276:659), que contiene el dominio constante kappa humano. El VH amplificado se insertó en un vector de expresión de células de mamífero pRK que codifica el dominio constante de IgG1 humana de longitud completa. La secuencia de las cadenas pesada y ligera se determinó utilizando métodos convencionales.

Cristalización, determinación y refinamiento de la estructura

40 El DEC de FGFR3-IIIb humano (restos 143-374) se clonó en el vector pAcGP67A (BD Bioscience, San José, CA), se produjo en células T.ni Pro y se purificó usando una columna de Ni-NTA seguida de cromatografía de exclusión por tamaño. El Fab para R3Mab se expresó en *E. coli* y se purificó secuencialmente sobre una columna de afinidad de proteína G, una columna de sepharose SP y una columna Superdex 75. El complejo Fab-FGFR3 se generó incubando el Fab con un exceso de DEC de FGFR3, y luego el complejo se desglucosiló y purificó en una columna de tamaños Superdex-200 en tampón TrisCl 20 mM pH 7,5 y NaCl 200 mM. Las fracciones que contenían el complejo se agruparon y se concentraron hasta 20 mg/ml, y se usaron en ensayos de cristalización. Los cristales utilizados en la determinación de la estructura se crecieron a 4 °C a partir de las siguientes condiciones: Cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6,5, MPD al 40 % y PEG8000 al 5 % utilizando el método de difusión de vapor. Los datos se procesaron utilizando HKL2000 y Scalepack (56). La estructura se resolvió con sustitución molecular usando el programa Phaser (57) y las coordenadas de 1RY3 (FGFR3) y 1N8Z (fragmento Fab). El modelo se completó usando el programa Coot (58) y la estructura se refinó a R/R_{libre} del 20,4 %/24,3 % con el programa Refmac (59). Las coordenadas y los factores estructurales se depositaron en el Protein Data Bank con el código de referencia 3GRW y también se divulgan en el documento USSN 61/163.222, presentado el 25 de marzo de 2009.

55 Ensayo de ADCC

Se aislaron CMSP humanas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre heparinizada, y la ADCC se midió utilizando las líneas celulares de mieloma múltiple OPM2 o KMS11 o las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 o UMUC-14 como diana, y CMSP como células efectoras en una relación de dianas:efectoras de 1:100. Las células diana (10.000 células/pocillo) se trataron con R3Mab o con IgG1 humana de control durante 4 horas a 37 °C. La citotoxicidad se determinó midiendo la liberación de LDH mediante el ensayo de integridad de membrana homogénea CytoTox-ONE siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Los resultados se expresan como el porcentaje de citólisis específica utilizando la fórmula: Citotoxicidad (%) = [(Lisis experimental - Lisis espontánea experimental) / (Lisis máxima diana - lisis espontánea diana)] x 100, donde la lisis espontánea es la citólisis no específica en ausencia de anticuerpo, y la lisis máxima diana se induce con Triton X-100 al 1 %.

Resultados

Atenuación génica inducible por ARNhc de FGFR3 atenúa el crecimiento del cáncer de vejiga in vivo

5 Como un paso previo a la evaluación de la importancia de FGFR3 para el crecimiento de tumores de vejiga *in vivo*, los inventores examinaron la atenuación génica de FGFR3 *in vitro*. Varios ARN de interferencia pequeños (ip) para FGFR3 regularon a la baja a FGFR3 de forma eficaz en líneas celulares de cáncer de vejiga que expresan FGFR3 de TS (RT112, RT4, SW780) o mutante (UMUC-14, mutación S249C). La atenuación génica de FGFR3 en las cuatro líneas celulares suprimió notablemente la proliferación en cultivo (Figura 15). A continuación, los inventores generaron líneas celulares RT112 estables que expresaban ARNhc para FGFR3 inducible por doxiciclina. La inducción mediante doxiciclina de tres ARNhc para FGFR3 independientes disminuyó la expresión de FGFR3, mientras que la inducción de un ARNhc de control dirigido a la EGFP no tuvo efecto (Figura 7A). En ausencia de FGF exógeno, el tratamiento con doxiciclina redujo la incorporación de [³H]-timidina por parte de células que expresaban distintos ARNhc para FGFR3, pero no el ARNhc de control (Figura 7B), lo que confirma que la atenuación génica de FGFR3 inhibe la proliferación. Un análisis adicional de las células RT112 en crecimiento exponencial reveló que la atenuación génica de FGFR3 durante un tratamiento de 72 horas con doxiciclina redujo marcada y específicamente el porcentaje de células en las fases S y G2 del ciclo celular, con un aumento concomitante de células en fase G1 (Figura 7C). Se observó un efecto similar con otros dos ARNhc para FGFR3 (Figura 16A). No se detectaron números significativos de células con un contenido de ADN subdiploide, lo que sugiere que no hubo cambios en los niveles de apoptosis. Por tanto, el efecto inhibitorio de la atenuación génica de FGFR3 sobre la proliferación de células RT112 se debe principalmente a la atenuación de la progresión del ciclo celular.

A continuación, los inventores evaluaron el efecto de la atenuación génica de FGFR3 sobre el crecimiento de xenoinjertos tumorales de RT112 preestablecidos en ratones. La atenuación génica de FGFR3 suprimió de sustancial y específicamente el crecimiento tumoral (Figura 7D, paneles superiores y Figura 16B). El análisis de las muestras de tumor del día 45 confirmó la atenuación génica eficaz de FGFR3 tras la inducción con doxiciclina de ARNhc para FGFR3 en comparación con el ARNhc de control (Figura 7D, paneles inferiores). Estos resultados demuestran que FGFR3 es de importancia crucial tanto *in vitro* como *in vivo* para el crecimiento de células de cáncer de vejiga RT112.

Generación de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-FGFR3

Para examinar adicionalmente la importancia de FGFR3 en el crecimiento tumoral y explorar el potencial de este receptor como diana terapéutica, los inventores desarrollaron un anticuerpo monoclonal anti-FGFR3 antagonista (denominado R3Mab) utilizando un enfoque de presentación en fagos. Los inventores seleccionaron este anticuerpo en particular en función de su capacidad para bloquear tanto la unión del ligando como la dimerización de FGFR3, y su capacidad exclusiva para inhibir no solo FGFR3 de TS, sino también los mutantes de este receptor asociados con el cáncer más prevalentes (véase más abajo). R3Mab se dirige a los dominios extracelulares IgD2 e IgD3 de FGFR3, que son necesarios y suficientes para la unión de FGF (4). R3Mab se unió a las isoformas IIIb y IIIc de FGFR3 humano, pero no mostró unión detectable a FGFR1, FGFR2 o FGFR4 (Figura 8A). El análisis de Biacore indicó que R3Mab tenía una afinidad aparente similar para FGFR3-IIIc murino, de macaco cangrejero y humano (datos no mostrados). La afinidad de R3Mab por FGFR3 humano se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Afinidad de R3Mab por FGFR3 humano determinada por análisis de Biacore.

DEC de FGFR3 humano	R3 Mab capturado en chips		
	kon/(1/Ms)	koff(1/s)	Kd(M)
IIIb	1,80E+06	2,00E-04	1,11E-10
IIIc	9,10E+04	3,20E-04	3,52E-09

45 A continuación, los inventores probaron la capacidad de R3Mab para bloquear la unión de FGFR3 a FGF1 y FGF9. R3Mab inhibió fuertemente la unión de FGF1 a FGFR3-IIIb y -IIIc, con concentraciones inhibitorias semimáximas (CI₅₀) de 0,3 nM y 1,7 nM, respectivamente (Figura 8B,C). De forma similar, R3Mab bloqueó de manera eficaz la unión de FGF9 a FGFR3-IIIb y -IIIc, con una CI₅₀ de 1,1 nM y 1,3 nM, respectivamente (Figura 8D, E).

R3Mab inhibe a FGFR3 de TS y sus variantes mutantes asociadas al cáncer más prevalentes

Para examinar si R3Mab inhibe la proliferación celular impulsada por FGFR3 de TS o mutante, los inventores aprovecharon la observación de que la expresión ectópica de FGFR3 en células pro-B murinas Ba/F3 confiere proliferación y supervivencia interleucina independientes de interleucina (IL)-3, dependientes de FGF1 (29). En ausencia de FGF1 y/o IL-3, las células Ba/F3 que expresaban de forma estable FGFR3 de TS no eran viables, mientras que FGF1 mejoró mucho su proliferación (Figura 9A). R3Mab bloqueó específicamente la proliferación de células Ba/F3-FGFR3 estimulada por FGF1 de una manera dependiente de la dosis (Figura 9A). A continuación, los inventores evaluaron el impacto de R3Mab sobre la señalización de FGFR3 en estas células. FGF1 indujo la fosforilación y activación de FGFR3 y la activación concomitante de p44/42 MAPK, mientras que R3Mab suprimió de forma eficaz la activación de ambas moléculas (Figura 9B).

En el cáncer de vejiga, las mutaciones somáticas activadoras en FGFR3 se agrupan dentro de la región de unión entre IgD2 y IgD3 el dominio yuxtamembrana extracelular o el dominio de cinasa (Figura 9C). Las sustituciones extracelulares de sentido erróneo dan lugar con mayor frecuencia a una cisteína desapareada, lo que conduce a la dimerización de FGFR3 independiente del ligando. Estas mutaciones provocan niveles marcadamente distintos de activación constitutiva de FGFR3, posiblemente debido a un impacto diferencial sobre la orientación del dominio de cinasa citoplásmico (30, 31). Las mutaciones más frecuentes son S249C, Y375C, R248C, G372C y K652E, que en conjunto representan el 98 % de todas las mutaciones de FGFR3 en el cáncer de vejiga (32). Los inventores razonaron que un agente terapéutico óptimo debería bloquear no sólo la proteína FGFR3 de TS, que se sobreexpresa en determinados cánceres, sino también los mutantes de FGFR3 asociados a los tumores más prevalentes. Para evaluar más R3Mab, los inventores generaron líneas de células Ba/F3 que expresan de manera estable cada una de las cinco variantes mutantes de FGFR3 más comunes. Todos los mutantes se expresaron a niveles similares en la superficie celular, y los mutantes de cisteína se dimerizaron espontáneamente sin ligando (datos no mostrados). Las líneas celulares que expresaban distintos mutantes de cisteína presentaron una respuesta de crecimiento variable a FGF1, de forma concordante con hallazgos anteriores (30, 31). Como se informó anteriormente (33), las células que expresan FGFR3^{R248C} presentaron proliferación constitutiva, independiente de ligando, y no respondieron a FGF1 (Figura 9D). De forma similar, la mutación más frecuente, FGFR3^{S249C}, confería proliferación independiente de ligando (Figura 9E). De forma notable, R3Mab suprimió la proliferación constitutiva impulsada por cualquiera de los mutantes (Figura 9 D, E). Las células que expresaban las mutaciones FGFR3^{G372C} (Figura 9F) o FGFR3^{Y375C} del dominio yuxtamembrana (Figura 9G) precisaban FGF1 para la proliferación, y R3Mab bloqueó completamente su crecimiento. Las células que expresaban FGFR3^{K652E} mostraron una proliferación débil independiente de ligando y un crecimiento significativo en respuesta a FGF1 (33). R3Mab no afectó la débil actividad basal de FGFR3^{K652E} (datos no mostrados), pero casi anuló la proliferación inducida por ligando mediada por este mutante (Figura 9H). Por tanto, R3Mab tiene una capacidad exclusiva de inhibir tanto el TS como los mutantes de FGFR3 prevalentes asociados con el cáncer. Además, R3Mab no presentó actividad agonista detectable.

Como un esfuerzo independiente, los inventores generaron y caracterizaron múltiples anticuerpos de hibridoma de ratón anti-FGFR3 humano. Ninguno de los anticuerpos de hibridoma pudo inhibir todos los mutantes de FGFR3 ligados al cáncer analizados por los inventores (Figura 17), ni compartieron epítopos solapantes con R3Mab.

Además, todos los anticuerpos de hibridoma mostraron actividad agonista, estimulando fuertemente la proliferación de los mutantes de FGFR3 ligados al cáncer R248C y S249C, y mostrando cierta estimulación de la proliferación de los mutantes Y375C y G370C. Los anticuerpos de hibridoma mostraron niveles diferenciales de antagonismo y agonismo, dependiendo del mutante de FGFR3 probado, de la siguiente manera:

	1G6	6G1	15B2
FGFR3-IIIb de tipo silvestre	inhibición	inhibición	inhibición
FGFR3-IIIb R248C	estimulación de 2X	estimulación de 4-5X	estimulación de 3-4X
FGFR3-IIIb S249C	estimulación de 2X	estimulación de 4-5X	estimulación de 4-5X
FGFR3-IIIb Y375C	estimulación de 1,2-1,5X	estimulación de 1,2-1,5X	estimulación de 1,2-1,5X
FGFR3-IIIb K652E	50 % de inhibición	inhibición del 60-70 %	inhibición
FGFR3-IIIc	inhibición	inhibición	inhibición
FGFR3-IIIc G370C	Sin efecto	inhibición del 20-30 %	inhibición del 10-2-%

Por tanto, los anticuerpos de hibridoma mostraron un efecto diferencial impredecible sobre la proliferación celular de células Ba/F3 impulsada por diversos mutantes de FGFR3.

Caracterización de anticuerpos de hibridoma anti-humano FGFR3 de ratón

Los anticuerpos de hibridoma anti-FGFR3 humano de ratón se caracterizaron adicionalmente de la siguiente manera:

(1) En un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la unión de FGF1 a las isoformas FGFR3-IIIb y IIIc humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 eran capaces de bloquear de forma eficaz la unión de FGF1 a las isoformas FGFR3-IIIb y IIIc humanas de una manera dependiente de la dosis. Cuando se prueba en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 2000 a 0,49 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF1 a FGFR3-IIIb con valores de CI50 de 0,69, 0,87 y 0,72 nM. Cuando se prueba en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 5000 a 1,2 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF1 a FGFR3-IIIc con valores de CI50 de 0,57, 3,4 y 0,7 nM, respectivamente.

(2) En un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la unión de FGF9 a las isoformas FGFR3-IIIb y IIIc humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon eficazmente la unión de FGF1 a las isoformas FGFR3-IIIb y IIIc humanas de una manera dependiente de la dosis. Cuando se probaron en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 2000 a 0,49 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF9 a FGFR3-IIIb con valores de CI50 de 0,13, 0,16 y 0,07 nM, respectivamente.

Cuando se prueba en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 5000 a 1,2 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF9 a FGFR3-IIIc con valores de CI50 de 0,13, 0,11 y 0,07 nM, respectivamente.

(3) La afinidad de unión de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 de longitud completa 1G6, 6G1 y 15B2 se determinó usando análisis de Biacore. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Anticuerpo	FGFR3-IIIB			FGFR3-IIIC		
	kon ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	koff (10^{-4} s^{-1})	Kd (nM)	kon ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	koff (10^{-4} s^{-1})	Kd (nM)
mIgG 1G6	2,2	3,1	1,4	2,2	2,8	1,3
mIgG 6G1	2,7	3,8	1,4	2,6	3,2	1,2
mIgG 15B2	4,1	29	7,1	3,5	39	11,1

(4) En un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3-IIIb o IIIc humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 eran capaces de bloquear la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3-IIIb o IIIc humano de una manera dependiente de la dosis. Cuando se prueban en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 0,01 a 100 ug/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3-IIIb con valores CI50 de 3-5 nM, 3 nM y 6-8 nM, respectivamente, y bloquearon la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3-IIIc con valores de CI50 de 10-35 nM, 24 nM y 60 nM, respectivamente.

(5) En un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la señalización inducida por FGF1 en células Ba/F3 que expresan FGFR3-IIIb humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 podían bloquear la señalización inducida por FGF1 en células Ba/F3 que expresaban FGFR3-IIIb humano de manera dependiente de la dosis cuando se probaron en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 0,25 a 6,75 ug/ml. En este experimento se usaron 25 ng/ml de FGF1. En ausencia de FGF1, el tratamiento con anticuerpos no tuvo efecto sobre la activación de FGFR3.

(6) En un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la señalización inducida por FGF1 en células Ba/F3 que expresan FGFR3-IIIc humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 podían bloquear la señalización inducida por FGF1 en células Ba/F3 que expresaban FGFR3-IIIc humano de manera dependiente de la dosis cuando se probaron en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 0,25 a 6,75 ug/ml. En este experimento se usaron 25 ng/ml de FGF1. En ausencia de FGF1, el tratamiento con anticuerpos no tuvo efecto sobre la activación de FGFR3.

Base estructural para la interacción de R3Mab con FGFR3

Para obtener información sobre el modo de interacción de R3Mab con FGFR3, los inventores sintetizaron un grupo de 13 péptidos solapantes que abarcaban las regiones de IgD2 y D3 de FGFR3-IIIb y analizaron su unión a R3Mab. Los péptidos 3 (restos 164-178) y 11 (restos 269-283) mostraron unión específica a R3Mab, teniendo el péptido 3 una interacción más fuerte (Figura 10A), lo que indica que las regiones correspondientes en FGFR3 son cruciales para el reconocimiento por parte de R3Mab. Estudios cristalográficos previos de FGFR1 formando un complejo con FGF2 identificaron restos del receptor cruciales implicados en la unión directa a FGF y a heparina, así como en la dimerización del receptor (34). El alineamiento de los péptidos 3 y 11 de FGFR3 con los sitios funcionalmente importantes en FGFR1 reveló que estos péptidos abarcan los restos de FGFR1 correspondientes esenciales para la unión directa de FGF2, la dimerización del receptor, así como la interacción con la heparina (Figura 10B). Estos datos indican que el epítipo de R3Mab en FGFR3 solapa con los restos del receptor implicados en la asociación del ligando y la interacción receptor-receptor.

A continuación, los inventores cristalizaron el complejo entre el fragmento Fab de R3Mab y la región extracelular IgD2-D3 de FGFR3-IIIb humano, y determinaron la estructura por rayos X a una resolución de 2,1 Å (Figura 10 C, D; Tabla 4). En este complejo, aproximadamente 1400 Å² y 1500 Å² de las superficies accesibles a disolventes están enterradas en FGFR3 y el Fab, respectivamente. Aproximadamente el 80 % de la interfaz enterrada involucra a la región IgD2, mientras que el resto implica al enlazador y la región IgD3. En el lado del Fab del complejo, aproximadamente el 40 % de la interfaz enterrada implica a la región determinante de complementariedad (CDR)-H3, el 20 % de CDR-H2, el 20 % de CDR-L2, y las contribuciones menores provienen de otros restos de CDR y del armazón. Notablemente, los aminoácidos (los AA) de CDR-H3 forman dos cadenas β, que extienden la lamina β de IgD2 (Figura 10D). El Fab interactúa con los AA que constituyen el sitio de unión a FGF de FGFR3, así como con los restos que forman la interfaz de dimerización del receptor, como se identificó anteriormente en diversos complejos diméricos FGF:FGFR (por ejemplo, código de PDB 1CVS, (34); y Figura 10C, áreas en gris/rayado y gris oscuro). Las interfaces de interacción identificadas por cristalografía fueron totalmente concordantes con los datos basados en péptidos (Figura 18 A, B). En conjunto, estos resultados revelan cómo R3Mab inhibe la unión del ligando y sugieren además que la unión de R3Mab a FGFR3 puede prevenir la dimerización del receptor. Los aminoácidos de FGFR3 que contactan con R3Mab se muestran en la Tabla 5. Las coordenadas cristalográficas de esta estructura están depositadas en el Protein Data Bank con el código de referencia 3GRW.

Tabla 4: Sumario del análisis cristalográfico

<u>Recogida de datos</u>	FGFR3-IIIb: Fab de R3Mab
Grupo espacial	P212121
Parámetros de celda	a=58,5, b=99,3, c=143,7
Resolución (Å)	25-2,1
R _{sim} ^a	0,098 (0,663) ^b
Número de observaciones	288498
Reflexiones exclusivas	49851
Compleitud (%)	99,9 (100,0) ^b
Refinamiento	
Resolución (Å)	20-2,1
Número de reflexiones	46714
R ^c final, R _{libre} (F>0)	0,187, 0,224
Número de átomos que no son H	5270
Número de aminoácidos	650
Sulfato	1
Azúcar	1
Átomos de disolvente	274
Enlaces Rmsd (Å)	0,011
Ángulos Rmsd (°)	1,4

^a $R_{sim} = \sum ||-<I>| / \sum I$. $<I>$ es la intensidad promedio de las observaciones relacionadas con la simetría de una reflexión única.

^b Los números entre paréntesis se refieren a la corteza de mayor resolución.

^c $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. R_{libre} se calcula como R, pero para el 5 % de los reflejos excluidos de todo el refinamiento.

Tabla 5: Restos en FGFR3 que están en contacto con R3Mab

Superficie enterrada de restos en la interfaz

THR 154 0,10
 ARG 155 16,50
 ARG 158 105,40
 MET 159 6,00
 LYS 161 52,50
 LYS 162 1,70
 LEU 163 12,30
 LEU 164 55,10
 ALA 165 10,10
 VAL 166 10,60
 PRO 167 45,50
 ALA 168 22,60
 ALA 169 63,60
 ASN 170 75,40
 THR 171 83,00
 VAL 172 1,70
 ARG 173 91,70
 PHE 174 1,50
 ARG 175 95,60
 PRO 177 15,90
 GLY 202 2,10
 LYS 205 63,40
 ARG 207 67,60
 GLN 210 31,60
 SER 212 0,40
 VAL 214 26,40

(continuación)

Superficie enterrada de restos en la interfaz

GLU 216 48,90
 SER 217 1,80
 TYR 241 15,90
 LEU 246 3,10
 GLU 247 1,80
 ARG 248 46,90
 TYR 278 32,20
 SER 279 1,80
 ASP 280 19,80
 ALA 281 3,00
 GLN 282 24,80
 PRO 283 0,50
 SER 314 1,20
 GLU 315 82,60
 SER 316 33,20
 VAL 317 56,60
 GLU 318 51,50

Los inventores compararon la estructura R3Mab-FGFR3 con una estructura publicada anteriormente de FGFR3-IIIc formando un complejo con FGF1 (4, 35) (Figura 10E, 10F). La superposición de los complejos anticuerpo-receptor y ligando-receptor reveló que no existen diferencias conformacionales importantes dentro de los dominios de los receptores individuales, excepto en la región que distingue FGFR3-IIIc de FGFR3-IIIb; sin embargo, la orientación de IgD3 con respecto a IgD2 fue drásticamente distinta (Figura 10E, blanco y gris; Figura 10F, malla blanca y gris). Dado que las posiciones relativas de IgD2 e IgD3 son cruciales para la unión del ligando, la conformación alternativa adoptada por IgD3 tras la unión de R3Mab puede proporcionar un mecanismo adicional para evitar la interacción del ligando con FGFR3.

R3Mab inhibe a FGFR3 mutante y de TS endógeno en células de cáncer de vejiga

Para evaluar si R3Mab pudiera suprimir la función de FGFR3 en células de cáncer de vejiga, los inventores examinaron en primer lugar las líneas celulares RT112 y RT4, que expresan FGFR3 de TS. R3Mab inhibió fuertemente la incorporación de [³H]-timidina por parte de las células RT112 (Figura 11A) y ejerció una significativa aunque más moderada supresión de la proliferación de células RT4 (Figura 19A). Para investigar el efecto de R3Mab sobre la activación de FGFR3, los inventores examinaron la fosforilación de FGFR3 en células RT112. De forma concordante con los resultados en células Ba/F3-FGFR3 (Figura 9B), R3Mab atenuó notablemente la fosforilación de FGFR3 inducida por FGF1 (Figura 11B). A continuación, los inventores examinaron la fosforilación de FRS2 α , AKT y p44/42 MAPK, tres mediadores aguas abajo de la señalización de FGFR3. FGF1 activó fuertemente estas moléculas en células RT112, mientras que R3Mab disminuyó significativamente esta activación (Figura 11B). De forma similar, R3Mab suprimió la fosforilación inducida por FGF1 de FGFR3 y MAPK en células RT4 (Figura 19B).

A continuación, los inventores investigaron si R3Mab pudiera inhibir la activación de FGFR3 mutante endógeno en células de cáncer de vejiga humanas. S249C es la mutación de FGFR3 más frecuente en el cáncer de vejiga (Figura 9C). Dos líneas celulares disponibles, UMUC-14 y TCC-97-7, portan un alelo mutado FGFR3^{S249C} (Ref. 36 y datos no mostrados). Aunque R3Mab no afectó el crecimiento exponencial de las células UMUC-14 en cultivo (datos no mostrados), redujo significativamente el crecimiento clonal de estas células (Figura 11C). De manera específica, R3Mab redujo el número de colonias de más de 120 μ m de diámetro aproximadamente en el 77 % en comparación con el anticuerpo de control (Figura 11D). Adicionalmente, R3Mab inhibió la incorporación de [³H]-timidina por parte de células TCC-97-7 en cultivo (Figura 19C).

Se informa que la mutación S249C da como resultado la activación de FGFR3 independiente del ligando (26, 30). De hecho, FGFR3^{S249C} se fosforiló constitutivamente independientemente del tratamiento con FGF1 en células UMUC-14 y células TCC-97-7, mientras que R3Mab redujo la fosforilación constitutiva de FGFR3^{S249C} en comparación con el anticuerpo de control en ambas líneas celulares (Figuras 11E, 19D).

R3Mab inhibe la formación de dímeros por FGFR3^{S249C}

La capacidad de R3Mab para inhibir la señalización constitutiva de FGFR3^{S249C} y la proliferación en células de cáncer de vejiga fue sorprendente, teniendo en cuenta que este mutante puede experimentar dimerización unida por enlaces disulfuro independiente de ligando (26, 30). Para explorar cómo R3Mab inhibe a FGFR3^{S249C}, los inventores

examinaron el efecto de R3Mab sobre el estado oligomérico de este mutante en células UMUC-14. En condiciones reductoras, FGFR3^{S249C} migró como una única banda de ~97 kDa, de manera concordante con el tamaño monomérico (Figura 12A). En condiciones no reductoras, en células tratadas con anticuerpo de control una gran fracción de FGFR3^{S249C} apareció como una banda de ~200 kDa, independientemente de la adición de FGF1, indicando un estado

dimérico constitutivo (Figura 12A). El tratamiento con R3Mab disminuyó sustancialmente la cantidad de dímeros, con un aumento simultáneo de monómeros (Figura 12A). Sistemáticamente, R3Mab disminuyó el nivel de dímeros de FGFR3^{S249C} en células TCC-97-7 independientemente del tratamiento con FGF1 (Figura 19E).

¿Cómo disminuye R3Mab los niveles de dímeros de FGFR3^{S249C} en células de cáncer de vejiga? Una posible explicación es que puede romper el dímero de FGFR3^{S249C} a través de la internalización de FGFR3 inducida por anticuerpos y el tráfico a través de endosomas o lisosomas. Los inventores analizaron esta posibilidad interviniendo farmacológicamente sobre la endocitosis. No obstante, R3Mab disminuyó la cantidad de dímero en células UMUC-14 pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis, a pesar del bloqueo sustancial de la internalización de FGFR3^{S249C} (Figura 20 A, B). Por tanto, la disociación del dímero por R3Mab es independiente de la endocitosis. Otra posible explicación es que el FGFR3^{S249C} celular puede existir en un equilibrio dinámico monómero-dímero; por consiguiente, la unión de R3Mab a FGFR3^{S249C} monomérico podría impedir la formación de dímeros y, de este modo, desplazar el equilibrio hacia el estado monomérico. Para examinar esta posibilidad, los inventores utilizaron el agente que no penetra en las células ácido 5,5'-Ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB), que reacciona selectivamente con los grupos sulfhidrilo libres de las cisteínas no emparejados y los bloquea (37). El tratamiento de células UMUC-14 con DTNB condujo a la acumulación de monómeros de FGFR3^{S249C} a expensas de los dímeros (Figura 12B), lo que indica que FGFR3^{S249C} existe en un equilibrio dinámico entre monómeros y dímeros.

Para probar si R3Mab afecta este equilibrio, los inventores generaron una proteína recombinante soluble que comprende los dominios IgD2-D3 de FGFR3^{S249C} y aislaron los dímeros por cromatografía de exclusión por tamaño. Los inventores incubaron los dímeros con tampón o anticuerpos en presencia de una concentración muy baja de agente reductor (DTT 25 µM y analizaron el estado oligomérico del receptor por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. R3Mab aceleró significativamente la aparición de una banda de ~25 kDa que representa FGFR3^{S249C} monomérico a expensas del dímero de ~50 kDa, en comparación con controles simulados o de anticuerpos (Figura 12C); de hecho, a las 2 horas la disminución de dímeros fue sustancialmente más completa en presencia de R3Mab. Estos resultados indican que R3Mab desplaza el equilibrio entre los estados monomérico y dimérico de FGFR3^{S249C} a favor del monómero.

R3Mab no propicia la regulación a la baja de FGFR3

Los inventores examinaron el efecto de R3Mab (clon 184.6.1) y los anticuerpos de hibridoma anti-FGFR3 sobre la regulación a la baja de FGFR3 mediante el análisis de la internalización y la degradación de FGFR3 en células tratadas con anticuerpos para FGFR3. Las líneas celulares de cáncer de vejiga que expresan FGFR3 de tipo silvestre (RT112) o FGFR3 mutado (S249C en TCC97-7) se trataron con R3Mab o los anticuerpos de hibridoma 1G6 o 6G1 durante 4 a 24 horas, luego se recogieron los lisados celulares para el análisis por transferencia tipo western de los niveles totales de FGFR3. El tratamiento con R3 Mab no redujo los niveles de FGFR3, mientras que el tratamiento con los mab de hibridoma 1G6 y 6G1 redujo significativamente los niveles de FGFR3. Estos resultados sugirieron que R3Mab no propició la regulación a la baja de FGFR3, mientras que los mab 1G6 y 6G1 sí propiciaron la internalización y la regulación a la baja del receptor FGFR3. En un experimento distinto, los niveles de FGFR3 en la superficie se examinaron usando análisis por FACS. Después de 24 horas de tratamiento con R3Mab (clon 184.6.1) de células UMUC-14 (que contienen la mutación S249C de FGFR3), los niveles de FGFR3 en la superficie celular aumentaron ligeramente. Estos resultados demuestran que el tratamiento con R3Mab no propició la regulación a la baja de FGFR3.

R3Mab inhibe el crecimiento y la señalización de FGFR3 en múltiples modelos tumorales

A continuación, los inventores examinaron el efecto de R3Mab sobre el crecimiento de células de cáncer de vejiga *in vivo*. Los inventores inyectaron células RT112 (que expresan FGFR3 de TS) en ratones nu/nu, permitieron que los tumores crecieran hasta un volumen medio de ~150 mm³ y dosificaron a los animales dos veces por semana con vehículo o R3Mab. En comparación con el control del vehículo el día 27, el tratamiento con R3Mab a 5 o 50 mg/kg suprimió el crecimiento tumoral en aproximadamente el 41 % o el 73 %, respectivamente (Figura 13A). El análisis de los lisados de tumor recogidos 48 horas o 72 horas después del tratamiento mostró que R3Mab disminuyó notablemente el nivel de FRS2α fosforilado (Figura 13B). Curiosamente, los niveles totales de proteína FRS2α también fueron más bajos en los tumores tratados con R3Mab, lo que sugiere que la inhibición de FGFR3 puede conducir además a la regulación a la baja de FRS2α. R3Mab también redujo la cantidad de MAPK fosforilada en los tumores, sin afectar los niveles totales de MAPK (Figura 13B). Por tanto, R3Mab inhibe el crecimiento de xenoinjertos tumorales de RT112 junto con el bloqueo de la señalización mediante FGFR3 de TS.

A continuación, los inventores investigaron el efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos que expresan FGFR3 mutante. El tratamiento con R3Mab atenuó profundamente la progresión de tumores de Ba/F3-FGFR3^{S249C} (Figura 13C). Además, R3Mab inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de vejiga de UMUC-14 (Figura 13D). Para evaluar si R3Mab afecta la activación de FGFR3^{S249C} *in vivo*, los inventores evaluaron el nivel de dímero de FGFR3^{S249C} en lisados tumorales recogidos 24 horas o 72 horas después del tratamiento. En

condiciones no reductoras, la cantidad de dímero de FGFR3^{S249C} fue sustancialmente menor en los tumores tratados con R3Mab en comparación con el grupo de control, mientras que los niveles totales de FGFR3^{S249C}, a juzgar por la cantidad detectada en condiciones reductoras, mostró pocos cambios (Figura 13E). No se observó acumulación aparente del monómero FGFR3^{S249C} en los lisados tumorales, en contraste con los resultados en cultivo celular (Figura 13E frente a 12A). Esto podría deberse a la débil sensibilidad de detección del FGFR3 monomérico en condiciones no reductoras por parte del anticuerpo anti-FGFR3 policlonal de conejo utilizado en el presente estudio (Figura 21). Es importante destacar que, R3Mab también inhibió significativamente la fosforilación y activación de MAPK en tumores de UMUC-14 (Figura 13E), lo que sugiere que R3Mab inhibe la actividad de FGFR3^{S249C} *in vivo*. Los inventores no observaron pérdida de peso significativa u otras anomalías francas en ninguno de los estudios *in vivo*. Adicionalmente, en un estudio de seguridad realizado en ratones, R3Mab, que se une con una afinidad similar al FGFR3 humano y al murino, no ejerció ninguna toxicidad perceptible en ningún órgano, incluida la vejiga (datos no mostrados). En conjunto, estos datos indican que las exposiciones múltiples a R3Mab son bien toleradas en ratones.

La actividad antitumoral de R3Mab en modelos de xenoinjerto de mieloma múltiple implica la ADCC

Para evaluar si R3Mab pudiera tener potencial terapéutico para el mieloma múltiple, los inventores probaron en primer lugar el efecto de R3Mab sobre la proliferación y la supervivencia de tres líneas celulares t(4; 14)+ en cultivo. Las células UTM-2 portan FGFR3 de TS, mientras que OPM2 y KMS11 portan una sustitución K650E y Y373C, respectivamente (7). En cultivo, R3Mab anuló completamente la proliferación de células UTM-2 inducida por FGF9 (Figura 22A). R3Mab inhibió modestamente el crecimiento de las células OPM2, pero no tuvo efecto evidente sobre la proliferación de células KMS11 (Figura 22 B, C). Dado que las células UTM-2 no forman tumores en ratones, los inventores evaluaron la eficacia de R3Mab contra los tumores de OPM2 y KMS11. R3Mab anuló casi por completo el crecimiento de tumores de xenoinjertos de ambas líneas celulares (Figura 14 A, B).

La marcada diferencia en la actividad de R3Mab contra las células tumorales OPM2 y KMS11 *in vitro* e *in vivo* sugirió la posibilidad de que R3Mab pueda ser capaz de sustentar las funciones efectoras inmunitarias mediadas por el Fc contra estos tumores que sobreexpresan FGFR3. Ambas líneas celulares expresan altos niveles de CD55 y CD59 (datos no mostrados), dos inhibidores de la ruta del complemento; por consiguiente, no se observó citotoxicidad dependiente del complemento (datos no mostrados). A continuación, los inventores se enfocaron en la ADCC. La ADCC se produce cuando un anticuerpo se une a su antígeno en una célula diana y, a través de su región Fc, se acopla a los receptores de Fcγ (FcγR) expresados en células efectoras inmunitarias (38). Para probar la ADCC *in vitro*, los inventores incubaron células KMS11 u OPM2 con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana recién aisladas en presencia de R3Mab o de anticuerpo de control. R3Mab participó en una actividad citolítica de CMSP significativa contra ambas líneas celulares de mieloma (Figura 14 C, D). Por el contrario, R3Mab no sustentó la citólisis de células RT112 o UMUC-14 de cáncer de vejiga (Figura 14 E, F). Según lo medido por análisis de Scatchard, las células de mieloma múltiple expresan sustancialmente más FGFR3 en la superficie celular que las líneas celulares de carcinoma de vejiga (~ 5-6 veces más de receptores por célula; Figura 23 A, B).

Para abordar la contribución de la ADCC en la actividad de R3Mab *in vivo*, los inventores introdujeron la mutación D265A/N297A (DANA) previamente caracterizada en el dominio Fc del anticuerpo. Esta doble sustitución en el dominio Fc de un anticuerpo anula su unión a los FcγR (39), lo que impide el reclutamiento de células efectoras inmunitarias. La mutación DANA no modificó la unión de R3Mab a FGFR3 ni la inhibición de la actividad de FGFR3 *in vitro*, ni cambió la farmacocinética de R3Mab en ratones (datos no mostrados); sin embargo, anuló sustancialmente la actividad *in vivo* contra xenoinjertos de OPM2 o KMS11 (Figura 14 G, H). Por el contrario, la mutación DANA no modificó la actividad antitumoral de R3Mab hacia xenoinjertos de cáncer de vejiga RT112 y UMUC-14 (Figura 24 A, B). En conjunto, estos resultados sugieren que la ADCC dependiente del Fc desempeña un papel importante en la eficacia de R3Mab contra xenoinjertos de mieloma múltiple OPM2 y KMS11.

Estudios adicionales de xenoinjertos

R3Mab (clon 184.6.1N54S) se caracterizó adicionalmente de la siguiente manera:

- (a) Se probó R3Mab en cuanto a la eficacia *in vivo* utilizando un modelo de xenoinjerto tumoral basado en una línea celular de cáncer de hígado (Huh7) esencialmente como se describe anteriormente. Cuando se probó a una concentración de anticuerpo de 5 mg/kg y 30 mg/kg, R3Mab inhibió significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*. El crecimiento tumoral se inhibió en aproximadamente el 50 % en comparación con el crecimiento tumoral en los animales de control.
- (b) Se probó R3Mab en cuanto a la eficacia *in vivo* utilizando un modelo de xenoinjerto tumoral basado en una línea celular de cáncer de mama (Cal-51) que expresaba FGFR3 esencialmente como se describe anteriormente. Los resultados de este estudio de eficacia demostraron que el anticuerpo R3Mab era capaz de inhibir tumores *in vivo* cuando se prueba en un intervalo de concentración de anticuerpos de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg. El crecimiento tumoral se inhibió en aproximadamente el 30 % en comparación con el crecimiento tumoral en los animales de control.

Análisis

La asociación de la sobreexpresión de FGFR3 con un mal pronóstico en pacientes con mieloma múltiple t(4;14)+ y la actividad transformante de FGFR3 activado en varios modelos experimentales han establecido a FGFR3 como un importante impulsor oncogénico y, por lo tanto, como una diana terapéutica potencial en esta neoplasia maligna hemática. Por el contrario, a pesar de los informes de una alta frecuencia de mutación y/o sobreexpresión de FGFR3 en el carcinoma de vejiga (24, 25, 40), no se ha establecido un papel crucial para la señalización de FGFR3 en esta neoplasia maligna epitelial *in vivo*. Además, el potencial terapéutico de la inhibición de FGFR3 en el cáncer de vejiga aún no se ha definido. En este caso, los inventores demostraron que la intervención genética o farmacológica con FGFR3 inhibe el crecimiento de varios xenoinjertos de cáncer de vejiga humano en ratones. Estos resultados demuestran que la función de FGFR3 es crucial para el crecimiento tumoral en este contexto, subrayando la posible importancia de este receptor como impulsor oncogénico y diana terapéutica en el cáncer de vejiga. El bloqueo de la función de FGFR3 inhibió el crecimiento de xenoinjertos que expresaban tanto FGFR3 de TS como mutante, lo que sugiere que ambas formas del receptor pueden contribuir significativamente a la progresión del tumor de vejiga. Aunque con mucha menos frecuencia que en el cáncer de vejiga, se han identificado mutaciones o sobreexpresión de FGFR3 en otras neoplasias malignas de tumores sólidos, incluidos el carcinoma de cuello uterino (40), el carcinoma hepatocelular (41) y el cáncer de pulmón no microcítico (42, 43), lo que sugiere una posible contribución de FGFR3 a tipos adicionales de cáncer epitelial.

La evidente participación de FGFR3 en diversas neoplasias malignas identifica a este receptor como un interesante candidato para la terapia dirigida. Si bien se han descrito compuestos de molécula pequeña que pueden inhibir la actividad de cinasa de FGFR3 (18-22, 44), la estrecha homología de los dominios de cinasa dentro de la familia de FGFR ha dificultado el desarrollo de inhibidores selectivos de FGFR3. La falta de selectividad de los inhibidores informados dificulta discernir la contribución relativa de FGFR3 a la biología de tipos de cáncer específicos; además, puede conllevar problemas de seguridad, limitando los niveles máximos de dosis y, por tanto, limitando la inhibición óptima de FGFR3. Por lo tanto, para lograr un direccionamiento selectivo y específica de FGFR3, los inventores recurrieron a una estrategia basada en anticuerpos. Los inventores hicieron el razonamiento de que un anticuerpo terapéutico óptimo debería ser capaz de bloquear no solo el TS sino también los mutantes de FGFR3 vinculados al cáncer predominantes. Adicionalmente, dado que la dimerización de FGFR3 es crucial para su activación, un anticuerpo que no solo bloquea la unión del ligando sino que también interfiere con la dimerización del receptor podría ser superior. Las propiedades convenientes adicionales incluirían la capacidad de sustentar la función efectora mediada por Fc y la larga semivida en suero conferida por el armazón natural de un anticuerpo de longitud completa. Los inventores centraron sus esfuerzos de escrutinio e ingeniería genética para identificar una molécula de anticuerpo que combine todas estas características, conduciendo a la generación de R3Mab. Los estudios de unión demostraron la capacidad de R3Mab para competir con ligandos FGF en la interacción con las isoformas IIIb y IIIc de FGFR3. Otros experimentos con líneas celulares BaF/3 transfectadas confirmaron la notable capacidad de R3Mab para bloquear tanto los mutantes de FGFR3 prevalentes asociados con el cáncer como el TS. Además, R3Mab ejerció una actividad antitumoral significativa en varios modelos de xenoinjerto de cáncer de vejiga que expresan FGFR3 de TS o FGFR3^{S249C}, que es el mutante más común del receptor en esta enfermedad. Los estudios farmacodinámicos sugirieron que la actividad antitumoral de R3Mab en estos modelos se basa en la inhibición de la señalización de FGFR3, evidente por la disminución de la fosforilación de sus mediadores aguas abajo FRS2 α y MAPK. Estos datos refuerzan aún más la conclusión de que se precisa FGFR3 para la progresión del tumor de vejiga, como lo demuestran los estudios de los inventores con ARNhc de FGFR3.

Las mutaciones de FGFR3 en el cáncer de vejiga representan una de las alteraciones oncogénicas más frecuentes de una proteína cinasa en neoplasias malignas de tumores sólidos, lo que recuerda a la mutación común de B-Raf en el melanoma (45). La mayoría de las mutaciones activadoras en FGFR3 dan lugar a una cisteína desemparejada, lo que conduce a la dimerización del receptor independiente de ligando y a diversos grados de activación constitutiva. Un estudio anterior que utilizó un fragmento Fab anti-FGFR3 monovalente indicó una actividad inhibitoria diferencial contra mutantes específicos de FGFR3 (46); sin embargo, no se investigó la base molecular de este efecto variable. En comparación con los fragmentos de anticuerpos monovalentes, los anticuerpos bivalentes tienen la capacidad de inducir la agrupación de antígenos y, en el caso de los receptores tirosina cinasa, pueden provocar la oligomerización y activación del receptor. A pesar de su configuración bivalente de longitud completa, R3Mab presentó una inhibición universal de FGFR3 de TS y de un amplio espectro de mutantes de FGFR3, incluidas las variantes que son dependientes de ligando (FGFR3^{G372C}, FGFR3^{Y375C}), constitutivamente activas (FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}), o ambas (FGFR3^{K652E}). Estos resultados plantean la pregunta: ¿Cómo antagoniza R3Mab tanto al TS como a diversos mutantes de FGFR3, incluyendo variantes unidas por disulfuro?

Basándose en el alineamiento de secuencias con FGFR1, el epítipo peptídico reconocido por R3Mab se solapa con los restos de FGFR3 implicados en la unión al ligando y a heparina, así como en la dimerización del receptor. Esta conclusión fue confirmada por estudios cristalográficos del complejo entre R3Mab y las regiones extracelulares de FGFR3. La estructura de rayos X reveló que el anticuerpo se une a regiones de IgD2 e IgD3 que son cruciales para la interacción ligando-receptor, así como para el contacto receptor-receptor. Por tanto, R3Mab puede bloquear a FGFR3 de TS compitiendo por la unión del ligando e impidiendo la dimerización del receptor. R3Mab puede emplear un mecanismo similar para inhibir a FGFR3^{K652E}, que tiene baja actividad constitutiva, pero precisa ligando para la activación completa. Adicionalmente, la unión de R3Mab cambia la orientación relativa de IgD3 de FGFR3 con respecto a IgD2. Este hallazgo plantea la posibilidad formal de que el anticuerpo también pueda inhibir la activación del receptor al forzar una conformación que no conduce a la transducción de señales, una noción que precisa más estudio.

Para obtener una mejor comprensión de cómo R3Mab bloquea las variantes de FGFR3 que poseen una cisteína desemparejada, los inventores analizaron el mutante más común, FGFR3^{S249C}, de manera más detallada. Los experimentos con el bloqueante de sulfhidrilos libres DTNB indicaron un equilibrio dinámico entre el estado monomérico y el dímérico de FGFR3^{S249C}. Se ha informado de un equilibrio similar entre los estados oxidado y reducido modulados por reguladores redox endógenos para los receptores NMDA (46). La incubación de células de cáncer de vejiga que expresan FGFR3^{S249C} con R3Mab condujo a una disminución en la cantidad de dímeros de receptor y un aumento simultáneo del nivel de monómeros. Además, el fragmento IgD2-D3 purificado de FGFR3^{S249C} formaron dímeros en solución; cuando se incubaron con R3Mab, los dímeros desaparecieron sostenidamente mientras que el FGFR3^{S249C} monomérico se acumulaba. Junto con el análisis estructural, estos resultados sugieren que R3Mab captura FGFR3^{S249C} monomérico y dificulta su dimerización. Con el paso del tiempo, R3Mab desplaza el equilibrio hacia el estado monomérico, bloqueando la actividad del receptor constitutivo. Este mecanismo también podría explicar cómo R3Mab inhibe otros mutantes de cisteína de FGFR3.

Otro hallazgo importante de este estudio fue la potente actividad antitumoral de R3Mab contra las líneas celulares de mieloma múltiple t(4;14)+ OPM2 y KMS11 *in vivo*. Por el contrario, R3Mab tuvo un impacto de modesto a mínimo en la proliferación o supervivencia de estas células en cultivo. Las células OPM2 y KMS11 expresan niveles en superficie celular relativamente altos de FGFR3 (5-6 veces más altos que las células de carcinoma de vejiga RT112 y UMUC-14). Estas densidades de antígeno más altas pueden permitir que R3Mab sustente el reclutamiento eficaz de células efectoras inmunitarias portadoras de FcγR y la activación de la ADCC. De hecho, en presencia de CMSP humanas, R3Mab participó en la citólisis de células OPM2 y KMS11, pero no de células de cáncer de vejiga RT112 o UMUC-14. Además, la versión mutante DANA de R3Mab, que es incapaz de unirse al FcγR, no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de KMS11 u OPM2 *in vivo*, pero sí suprimió el crecimiento de los tumores de RT112 y UMUC-14 de forma similar a R3Mab. En conjunto, estos datos indican que R3Mab tiene un mecanismo doble de actividad antitumoral: (a) En células que expresan niveles en superficie más bajos de FGFR3 mutante o de TS, bloquea la señalización constitutiva o dependiente de ligando; (b) En células que expresan niveles de FGFR3 en superficie relativamente altos, induce ADCC.

Los resultados de los inventores también plantean algunas preguntas nuevas. En primer lugar, se desconoce por qué las líneas celulares de cáncer de vejiga analizadas en este estudio presentan una sensibilidad variable a R3Mab. Dicha respuesta diferencial, que es común para la terapia dirigida, puede ser un reflejo de la composición genética distinta de los tumores individuales. De hecho, las células de cáncer de mama positivas para Her2 muestran una sensibilidad variable al anticuerpo anti-Her2 (48), al igual que diversas células cancerosas en respuesta al anticuerpo anti-EGFR (49). En este contexto, se precisa urgentemente el desarrollo de modelos adicionales *in vivo* para el cáncer de vejiga con FGFR3 de TS y mutante, para evaluar la sensibilidad a las moléculas para FGFR3 en animales. Además, la elucidación de biomarcadores predictivos puede ayudar a identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de manera óptima de la terapia dirigida a FGFR3. En segundo lugar, dado que R3Mab no indujo la regresión tumoral en los modelos que examinaron los inventores, los estudios futuros deberían explorar si R3Mab puede cooperar con agentes terapéuticos establecidos.

En conclusión, los hallazgos de los inventores implican tanto a FGFR3 de TS como al mutante como importantes para el crecimiento del cáncer de vejiga, ampliando así la afectación oncogénica *in vivo* de este receptor en desde neoplasias hemáticas a epiteliales. Adicionalmente, los resultados de los inventores demuestran que tanto FGFR3 de TS como mutante pueden ser dianas eficaces en tumores de un anticuerpo de longitud completa que combine la capacidad de bloquear la unión del ligando, la dimerización y la señalización del receptor, así como para estimular la lisis de células tumorales por ADCC. Estos resultados proporcionan una sólida justificación para investigar terapias basadas en anticuerpos y dirigidas al FGFR3 en diversas neoplasias malignas asociadas a este receptor.

Listado parcial de referencias

1. Eswarakumar, V.P., Lax, I. y Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149.
2. L'Hote, C.G. y Knowles, M.A. 2005. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 304:417-431.
3. Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A. y Basilico, C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:233-247.
4. Mohammadi, M., Olsen, S.K. y Ibrahimi, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
5. Grose, R. y Dickson, C. 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179-186.
6. Chang, H., Stewart, A.K., Qi, X.Y., Li, Z.H., Yi, Q.L. y Trudel, S. 2005. Immunohistochemistry accurately predicts

FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma. *Blood* 106:353-355.

7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. y Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260-264.

8. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., *et al.* 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101:4569-4575.

9. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. y Avet-Loiseau, H. 2002. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100:1579-1583.

10. Pollett, J.B., Trudel, S., Stern, D., Li, Z.H. y Stewart, A.K. 2002. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance. *Blood* 100:3819-3821.

11. Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Larde, C., Caillaud, A., Diez de Medina, S.G., Cappellen, D., Graff, G., Thiery, J.P., Chopin, D., Ricol, D., *et al.* 2006. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 27:740-747.

12. Agazie, Y.M., Movilla, N., Ischenko, I. y Hayman, M.J. 2003. The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 22:6909-6918.

13. Ronchetti, D., Greco, A., Compasso, S., Colombo, G., Dell'Era, P., Otsuki, T., Lombardi, L. y Neri, A. 2001. Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Oncogene* 20:3553-3562.

14. Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M. y Bergsagel, P.L. 2001. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 97:729-736.

15. Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G. y Stewart, A.K. 2000. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood* 95:992-998.

16. Chen, J., Williams, I.R., Lee, B.H., Duclos, N., Huntly, B.J., Donoghue, D.J. y Gilliland, D.G. 2005. Constitutively activated FGFR3 mutants signal through PLCgamma-dependent and -independent pathways for hematopoietic transformation. *Blood* 106:328-337.

17. Li, Z., Zhu, Y.X., Plowright, E.E., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Patterson, B., Hawley, T.S., Hawley, R.G. y Stewart, A.K. 2001. The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. *Blood* 97:2413-2419.

18. Trudel, S., Ely, S., Farooqi, Y., After, M., Robbiani, D.F., Chesi, M. y Bergsagel, P.L. 2004. Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 103:3521-3528.

19. Trudel, S., Li, Z.H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C. y Stewart, A.K. 2005. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 105:2941-2948.

20. Chen, J., Lee, B.H., Williams, I.R., Kutok, J.L., Mitsiades, C.S., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., Coburn, A., *et al.* 2005. FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 24:8259-8267.

21. Paterson, J.L., Li, Z., Wen, X.Y., Masih-Khan, E., Chang, H., Pollett, J.B., Trudel, S. y Stewart, A.K. 2004. Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol* 124:595-603.

22. Grand, E.K., Chase, A.J., Heath, C., Rahemtulla, A. y Cross, N.C. 2004. Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074. *Leukemia* 18:962-966.

23. Gomez-Roman, J.J., Saenz, P., Molina, M., Cuevas Gonzalez, J., Escuredo, K., Santa Cruz, S., Junquera, C., Simon, L., Martinez, A., Gutierrez Banos, J.L., *et al.* 2005. Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* 11:459-465.

24. Tomlinson, D.C., Baldo, O., Harnden, P. y Knowles, M.A. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 213:91-98.

25. van Rhijn, B.W., Montironi, R., Zwarthoff, E.C., Jobsis, A.C. y van der Kwast, T.H. 2002. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol* 198:245-251.

26. Tomlinson, D.C., Hurst, C.D. y Knowles, M.A. 2007. Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene* 26:5889-5899.

27. Martinez-Torrecuadrada, J., Cifuentes, G., Lopez-Serra, P., Saenz, P., Martinez, A. y Casal, J.I. 2005. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res* 11:6280-6290.

28. Martinez-Torrecuadrada, J.L., Cheung, L.H., Lopez-Serra, P., Barderas, R., Canamero, M., Ferreiro, S., Rosenblum, M.G. y Casal, J.I. 2008. Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:862-873.

29. Ornitz, D.M. y Leder, P. 1992. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* 267:16305-16311.

30. d'Avis, P.Y., Robertson, S.C., Meyer, A.N., Bardwell, W.M., Webster, M.K. y Donoghue, D.J. 1998. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ* 9:71-78.

31. Adar, R., Monsonego-Ornan, E., David, P. y Yayon, A. 2002. Differential activation of cysteine-substitution mutants of fibroblast growth factor receptor 3 is determined by cysteine localization. *J Bone Miner Res* 17:860-868.

32. Knowles, M.A. 2008. Novel therapeutic targets in bladder cancer: mutation and expression of FGF receptors. *Future Oncol* 4:71-83.

33. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J. y Ornitz, D.M. 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13:233-237.

34. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. y Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98:641-650.

35. Olsen, S.K., Ibrahim, O.A., Raucchi, A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Yayon, A., Basilico, C., Linhardt, R.J., Schlessinger, J. y Mohammadi, M. 2004. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:935-940.

36. Jebar, A.H., Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F. y Knowles, M.A. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-5225.

37. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.

38. Adams, G.P. y Weiner, L.M. 2005. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.

39. Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W.P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W.Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., *et al.* 2005. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174:817-826.

40. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. y Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18-20.

41. Qiu, W.H., Zhou, B.S., Chu, P.G., Chen, W.G., Chung, C., Shih, J., Hwu, P., Yeh, C., Lopez, R. y Yen, Y. 2005. Over-expression of fibroblast growth factor receptor 3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11:5266-5272.

42. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K. y Eckhardt, F. 2008. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1494-1508.

43. Woelckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P., Bettstetter, M., Wuensch, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., *et al.* 2006. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol* 210:192-204.

44. Xin, X., Abrams, T.J., Hollenbach, P.W., Rendahl, K.G., Tang, Y., Oei, Y.A., Embry, M.G., Swinarski, D.E., Garrett, E.N., Pryer, N.K., *et al.* 2006. CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice. *Clin Cancer Res* 12:4908-4915.

45. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.

46. Trudel, S., Stewart, A.K., Rom, E., Wei, E., Li, Z.H., Kotzer, S., Chumakov, I., Singer, Y., Chang, H., Liang, S.B., *et al.* 2006. The inhibitory anti-FGFR3 antibody, PRO-001, is cytotoxic to t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* 107:4039-4046.

47. Gozlan, H. y Ben-Ari, Y. 1995. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol Sci* 16:368-374.

48. Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M. y Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172.

49. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J.D., Wolf, B., Sato, G. y Mendelsohn, J. 1984. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 44:1002-1007.

50. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K. y French, D.M. 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res* 68:5086-5095.

51. Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F. y Slamon, D. 1999. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18:2241-2251.

52. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S. y Fuh, G. 2004. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-1093.

53. Liang, W.C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., *et al.* 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366:815-829.

54. Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E. y Shepard, H.M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.

55. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C. y Fuh, G. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338:299-310.

56. Otwinowski, Z.a.M., W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276:307-326.

57. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C. y Read, R.J. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:458-464.

58. Emsley, P. y Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132.

59. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. y Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255. Divulgación

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-FGFR3 Y MÉTODOS QUE UTILIZAN LOS MISMOS

<130> 007422694

<150> EP13183384.0

<151> 24/03/2010

<150> 10722819.9
 <151> 24/03/2010

5 <150> PCT/US2010/028470
 <151> 24/03/2010

10 <150> 61/163.222
 <151> 25/03/2009

<160> 271

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 1

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

30 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 2

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

40 Lys Gly

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 3

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 4

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

10

<400> 4

	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
	1				5					10	

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 5

	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
	1				5		

25

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

35

<400> 6

	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr
	1				5				

40

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 7

	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Ser
	1				5					10

50

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

60

<400> 8

Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

5 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 9

Ala	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

Val	Met	Asp	Tyr
			20

20 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 10

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

30 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 11

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

45 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 12

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

5 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 13

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

15 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 14

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

30 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 15

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

40 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 50 <400> 16

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 17

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

15 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 18

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
 1 5

30 <210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

40 <400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

45 <210> 20
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 22
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 24
<211> 25
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 24

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
			20					25

10

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 25

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
			20					25

25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 26

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
			20					25

35

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

10

<210> 32
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 32

20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

35

<210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 40

 $\langle 211 \rangle$ 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 41

 $\langle 211 \rangle$ 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 44

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 45

	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
5	1				5					10

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 46

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
			20					25

20 <210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 47

30

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
1				5					10			

<210> 48

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

40 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 48

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Gly	Ile	Ser
1				5					10

45

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <400> 49

Gly Arg Ile Tyr Pro Leu Tyr Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 50

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 52

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 53

ES 2 932 874 T3

Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Thr
 1 5

5 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

15 <210> 55
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 55

Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Asp Ser Phe Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

30 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 56

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

40

45 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 57

ES 2 932 874 T3

	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
	1				5					10	

5 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 58

	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
	1				5		

15 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 59

	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Leu	Thr
	1				5				

30 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 60

	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Ser
	1				5					10

40 <210> 61
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 61

	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	1				5					10					15	

Lys Gly

55 <210> 62
 <211> 20
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 62

Ala	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

Val	Met	Asp	Tyr
			20

10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 63

Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

25

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 64

Gly	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser
1				5		

35

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

45

<400> 65

Gln	Gln	Ser	Ala	Ala	Asp	Pro	Tyr	Thr
1				5				

50

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 66

Gly	Phe	Ser	Phe	Thr	Gly	Thr	Gly	Ile	Ser
1				5					10

5

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 67

Gly	Ser	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Phe	Ala	Thr	Lys	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 68

30

Ala	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

Val	Met	Asp	Tyr
			20

35

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 69

45

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

50

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 70

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15 <400> 71

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

20

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 72

Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Thr Gly Ile Ser
1 5 10

30

<210> 73
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

40

<400> 73

Gly Arg Ile Tyr Pro Ala Phe Gly Ser Ser Ile Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

45

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

55

<400> 74

ES 2 932 874 T3

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 76

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 77

Gln Gln Thr Tyr Ser Ala Gln Pro Thr
1 5

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 78

Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 79
<211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 79

Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

<210> 80
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 80

Ala	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

Val	Met	Asp	Tyr
			20

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 81

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 82
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 82

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 5 <400> 83

 Gln Gln Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr
 1 5

 10 <210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 84
 20
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

 <210> 85
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 85

 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

 Lys Gly
 35
 <210> 86
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 86

 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

 Val Met Asp Tyr
 20

 50 <210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 87

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

10 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 88

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
1				5		

20 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 89

Gln	Gln	Ser	Thr	Gly	His	Pro	Gln	Thr
1				5				

35 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 90

Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Ser
1				5					10

50 <210> 91
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 91

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 92

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 93

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 94

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 95

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1

5

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 96

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 97
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 97

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 98
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 98

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 100

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

15 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 101

25 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 102

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

40 <210> 103
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 103

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

55 <210> 104
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 104

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

10 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 105

20 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 106
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 106

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

35 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 107

45 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

50 <210> 108
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 108

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

5 <210> 109
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 109

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

15 Lys Gly

20 <210> 110
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 110

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

30 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

40 <400> 111

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

45 <210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 112

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

5 <210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 113

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 114

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

30 <210> 115
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 115

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

40 Lys Gly

<210> 116
<211> 20
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
50 <400> 116

ES 2 932 874 T3

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

5 <210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 117

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
1 5 10

15 <210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 118

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

30 <210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 119

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 120
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

55 <210> 121
<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 121

Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5					10					15	

Lys Gly

<210> 122

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 122

Ala	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr
1				5					10					15	

Val	Met	Asp	Tyr
			20

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 123

Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 124

Ser	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 125

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

10

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 126

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

25

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 127

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

35

Lys Gly

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

45

<400> 128

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

50

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 129

	Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Ala
	1				5					10	

<210> 130
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 130

	Ser	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser
	1				5		

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 131

	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	Asn	Pro	Tyr	Thr
	1				5				

<210> 132
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 132

ES 2 932 874 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

- 5 <210> 133
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- 15 <400> 133

ES 2 932 874 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 134

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 134

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 932 874 T3

35

40

45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 135

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 135

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 136

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 136

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Leu Tyr Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

10

<210> 137

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 137

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

ES 2 932 874 T3

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 138

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 139

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 139

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Glu Thr Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 140

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 140

Arg Ala Ser Gln Asp Val Glu Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

20

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 141

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

35

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 5
 <400> 142

 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

 10 <210> 143
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 143
 20
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

 <210> 144
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 144

 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

 Lys Gly
 35
 <210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 45 <400> 145

 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

 Val Met Asp Tyr
 20

 50 <210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="Asp"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Ile"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Glu" o "Ser"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Ile"

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="Ser"

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /sustituir="Leu"

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(10)
 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

40 <400> 146

	Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Val	Asp	Thr	Ala	Val	Ala
	1				5					10	

45 <210> 147
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="Gly"

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia respecto a la anotación para dicha posición"

65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)

<223> /sustituir="Tyr"
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (6)..(6)
 <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia respecto a la anotación para dicha posición"
 <400> 147

 Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser
 10 1 5
 <210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir="Ser" o "Thr"
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /sustituir="Tyr" o "Ala"
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="Ser" o "Thr" o "Ala"
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Su" o "Asp" o "Thr" o "Asn"
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Pro" o "Ser"
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Tyr" o "Leu" o "Pro" o "Gln"
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para
 55 dichas posiciones"
 <400> 148

 Gln Gln Gly Thr Gly Ala Gln Ser Thr
 1 5
 60 <210> 149
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 10 <223> /sustituir="Thr"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 15 <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia respecto a la anotación para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 20 <223> /sustituir="Tyr" o "Ser" o "Thr"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 25 <223> /sustituir="Gly" o "Thr"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 30 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"
 <400> 149
 Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser
 35 1 5 10
 <210> 150
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Ala" o "Leu" o "Ser" o "Thr"
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Gln" o "Asp" o "Gly" o "Tyr" o "Ser" o "Asn" o "Phe"
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Asp" o "Gly"
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="Ser"
 65

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /sustituir="Phe" o "Thr" o "Ser"
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /sustituir="Su" o "Asn" o "Ile"
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(11)
 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para
 15 dichas posiciones"
 <400> 150
 Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Ala Ala Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly
 20
 <210> 151
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 30
 <400> 151
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Met Asp Tyr
 20
 <210> 152
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="Asp"
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia respecto a la anotación para dicha posición"
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Glu" o "Ser"
 55

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Ile"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="Ser"

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 152

20 Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala
 1 5 10

25 <210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir="Gly" o "Thr"

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /sustituir="Thr" o "Ala"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituir="Gly"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Su" o "Asn"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Ser"

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Gln" o "Tyr" o "Leu"

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para

dichas posiciones"

<400> 153

		Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr
5		1				5				

<210> 154
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 20 <223> /sustituir="Leu"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 25 <223> /sustituir="Tyr" o "Ser" o "Gly" o "Ala" o "Gln"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 30 <223> /nota="Los restos dado en la secuencia no tienen preferencia respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 35 <223> /sustituir="His"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 40 <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia respecto a la anotación para dicha posición"

<400> 154

	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	1				5					10					15	

45 Lys Gly

<210> 155
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*

<400> 155

	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His
55	1				5					10

<210> 156
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 932 874 T3

<400> 156

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

5

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 157

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

15

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 158

Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Ile Leu Ala Ser
1 5 10

25

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 159

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5 10

35

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 160

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5 10

40

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

45

<400> 161

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

50

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

55

<400> 162

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <400> 163

Gln Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Trp Thr
 10 1 5

<210> 164
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 164

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Tyr
 20 1 5 10

<210> 165
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 165

Gly Tyr Val Phe Thr His Tyr Asn Met Tyr
 30 1 5 10

<210> 166
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 166

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Tyr
 40 1 5 10

<210> 167
 <211> 20
 45 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 167

Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
 20

<210> 168
 <211> 20
 50 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 168
 55

Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
20

<210> 169

<211> 20

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 169

Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
20

<210> 170

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 170

Ala Ser Pro Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 171

Ala Arg Gly Gln Gly Pro Asp Phe Asp Val
1 5 10

<210> 172

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 172

Ala Arg Trp Gly Asp Tyr Asp Val Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 173

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 173

ES 2 932 874 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 174

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15

<400> 174

ES 2 932 874 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 175

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 175

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 176

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 177

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5

<400> 177

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

10

<210> 178
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 178

20

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25

<210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 179

30

Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala
 1 5 10 15

35

<210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 180

40

Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
 1 5 10 15

45

<210> 181
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 181

His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser
 1 5 10 15

50

<210> 182
 <211> 15

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

5

Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro
 1 5 10 15

<210> 183
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 183

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

20

<210> 184
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 184

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

35

<210> 185
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 185

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

45

<210> 186
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

55

<400> 186

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 187

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 187

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 188

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 188

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 189

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 189

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 190

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5 <210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 191

15 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 192
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

25 <400> 192

gatccccgca tcaagctgcg gcatcattca agagatgatg ccgcagcttg atgctttttt 60

ggaaa 65

30 <210> 193
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 193

gatcccctgc acaacctcga ctactattca agagatagta gtcgagggtg tgcatttttt 60

40 ggaaa 65

45 <210> 194
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 194

	gatccccaac ctcgactact acaagattca agagatcttg tagtagtcga ggtttttttt	60
	ggaaa	65
5	<210> 195 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 195	
15	gtcagatatc gtkotsacmc artctccwgc	30
20	<210> 196 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
25	<400> 196	
	gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg	37
30	<210> 197 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 197	
40	gtcagatatc gtgctgacmc artctcc	27
45	<210> 198 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 198	
	gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg	37
55	<210> 199 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	

	<400> 199	
	gtacgatatc cagatgacmc artctcc	27
5	<210> 200 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
15	<400> 200	
	gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg	37
20	<210> 201 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 201	
30	tttdakytcc agcttggtac c	21
35	<210> 202 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 202	
	acagtggggcc cttggtggag gctgmr gaga cdgtgashrd rgt	43
45	<210> 203 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"	
	<400> 203	
55	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly 1 5 10	
60	<210> 204 <211> 32 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente	

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 204

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 205

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 205

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 206

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 206

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 207

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 207

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 208

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 208

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
5	1				5					10	

<210> 209

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 209

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
1				5					10			

20 <210> 210

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 210

30

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	

Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			20					25					30	

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

40

<400> 211

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

45

<210> 212

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <400> 212

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 213

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 213

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 214

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 214

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 215

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 215

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 216

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 216

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 217

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 218

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 219

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 219

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 220

ES 2 932 874 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 221
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 221

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

15 <210> 222
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 222

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

30 <210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 223

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40 <210> 224
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 224

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

55 <210> 225
<211> 30

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 225

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 226
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 226

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 227
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 227

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 228
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 228

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 229
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 229

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

10

<210> 230

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 230

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
1				5					10			

25

<210> 231

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 231

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

35

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

40

<210> 232

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 232

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

50

<210> 233

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 233

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 234

<211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 234

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 235

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 235

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 236

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 236

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 237

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 237

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 238

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 238

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 239

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 240

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 240

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 241

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 241

ES 2 932 874 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 242
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 242

15 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

20 <210> 243
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 243

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

30 <210> 244
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 244

40 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

45 <210> 245
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 245

55 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 246
<211> 31

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 246

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser
			20					25					30	

<210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 247

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 248

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
1				5					10				

<210> 249
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 249

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 250
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 250

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
10	1				5					10	

<210> 251
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 251

	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	1				5					10			

25 <210> 252
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 252

35

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

40 <210> 253
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 45 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 253

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
50	1				5					10	

<210> 254
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 254

5 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 255

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15

<400> 255

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

20 <210> 256

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 256

30 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 257

 $\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 257

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

45

<210> 258

 $\langle 211 \rangle$ 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

$\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

55 <400> 258

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 259

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 260

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 260

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 261

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 261

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 262

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

5 <210> 263
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 263

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

15 <210> 264
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 264

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

30 <210> 265
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 265

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

40 <210> 266
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 266

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

55 <210> 267
 <211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 267

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 268

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 268

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

25 <210> 269

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 269

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 270

<211> 32

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 270

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

50 <210> 271

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 271

10	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
	1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende:

- (a) un anticuerpo antagonista anti-FGFR3 aislado, en donde el anticuerpo comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia RASQDVDTSLA (SEQ ID NO: 87), una HVR-L2 que comprende la secuencia SASFLYS (SEQ ID NO: 88), la HVR-L3 comprende la secuencia QQSTGHPQT (SEQ ID NO: 89), una HVR-H1 que comprende la secuencia GFTFTSTGIS (SEQ ID NO: 84), una HVR-H2 que comprende la secuencia GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEQ ID NO: 85) y una HVR-H3 que comprende la secuencia ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO: 86); y
- (b) un agente citotóxico.

2. La formulación de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo antagonista para FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 132 y/o una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 133.

3. La formulación de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, una toxina y un isótopo radiactivo.

4. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo con afinidad madurada, un anticuerpo humano y un anticuerpo biespecífico.

5. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 es un fragmento de anticuerpo.

6. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 posee actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 comprende una secuencia de armazón y al menos una porción de la secuencia de armazón es una secuencia de armazón consenso humana, en particular una secuencia de armazón consenso del subgrupo κ humana y/o una secuencia de armazón consenso del subgrupo λ humana de cadena pesada.

8. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento del cáncer.

9. Un anticuerpo antagonista anti-FGFR3 aislado, para su uso en combinación con un agente citotóxico en el tratamiento del cáncer, en donde dicho anticuerpo antagonista anti-FGFR3 comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia RASQDVDTSLA (SEQ ID NO: 87), una HVR-L2 que comprende la secuencia SASFLYS (SEQ ID NO: 88), la HVR-L3 comprende la secuencia QQSTGHPQT (SEQ ID NO: 89), una HVR-H1 que comprende la secuencia GFTFTSTGIS (SEQ ID NO: 84), una HVR-H2 que comprende la secuencia GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEQ ID NO: 85) y una HVR-H3 que comprende la secuencia ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO: 86).

10. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 9, en donde dicho anticuerpo antagonista para FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende el SEQ ID NO: 132 y/o una región variable de cadena ligera que comprende el SEQ ID NO: 133.

11. El anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 9 o 10, en donde dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, una toxina y un isótopo radiactivo.

12. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo con afinidad madurada, un anticuerpo humano y un anticuerpo biespecífico.

13. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 es un fragmento de anticuerpo.

14. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 posee actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

15. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 comprende una secuencia de armazón y al menos una porción de la secuencia de armazón es una secuencia de armazón consenso humana, en particular una secuencia de armazón consenso del subgrupo κ humana y/o una secuencia de armazón consenso del subgrupo λ humana de cadena pesada.

16. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo antagonista anti-FGFR3 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-7, conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco,

un agente inhibidor del crecimiento, una toxina o un isótopo radiactivo.

Clon n.º	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
184.6	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.62	G	F	T	F	S	T	T	G	I	S
184.6.21	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.49	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.51	G	F	S	F	T	G	T	G	I	S
184.6.52	G	F	T	F	Y	T	T	G	I	S
184.6.92	G	F	S	F	W	S	T	G	I	S
184.6.1.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.NS D30E	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S

Clon n.º	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
184.6	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.62	G	R	I	Y	P	L	Y	G	S	T	H	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.21	G	R	I	Y	P	Y	D	D	S	F	Y	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.49	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.51	G	S	I	Y	P	Y	F	A	T	K	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.52	G	R	I	Y	P	A	F	G	S	S	I	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.92	G	R	I	Y	P	S	S	A	T	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.NS D30E	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 1A

Clon n.º	H3									A	B	C	D							101	102
	93	94	95	96	97	98	99	100													
184.6	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.62	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.21	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.49	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.51	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.52	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.92	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.NS D30E	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	

Clon n.º	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
184.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.1	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A
184.6.58	R	A	S	Q	D	V	D	I	S	L	A
184.6.62	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.21	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.49	R	A	S	Q	V	I	D	I	S	L	A
184.6.51	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.92	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
184.6.1.N54S	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A
184.6.1.N54G	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A
184.6.1.N54A	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A
184.6.1.N54Q	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A
184.6.58.N54S	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A
184.6.58.N54G	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A
184.6.58.N54A	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A
184.6.58.N54Q	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A
184.6.1.NS D30E	R	A	S	Q	D	V	E	T	S	L	A

FIG. 1B

Clon n.º	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
184.6	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58	S	A	S	S	L	A	S
184.6.62	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.21	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.49	G	A	S	T	L	A	S
184.6.51	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.52	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.92	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54S	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54G	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54A	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54Q	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58.N54S	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54G	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54A	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54Q	S	A	S	S	L	A	S
184.6.1.NS D30E	S	A	S	F	L	Y	S

Clon n.º	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
184.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.1	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.62	Q	Q	T	Y	T	T	S	L	T
184.6.21	Q	Q	S	Y	T	T	P	L	T
184.6.49	Q	Q	S	A	A	D	P	Y	T
184.6.51	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.52	Q	Q	T	Y	S	A	Q	P	T
184.6.92	Q	Q	S	Y	S	H	Q	S	T
184.6.1.N54S	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54G	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54A	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54Q	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58.N54S	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54G	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54A	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54Q	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.1.NS D30E	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T


FIG. 1C

Clon 184.6.1.N54S

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGTLV (SEQ ID NO: 132)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:133)

Clon 184.6.58

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPTNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGTLV (SEQ ID NO:134)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGAGNPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:135)

Clon 184.6.62

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPLYGSTHYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGTLV (SEQ ID NO:136)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTTSITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:137)

Clon 184.6.1.NS D30E

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGTLV (SEQ ID NO:138)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVETSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:139)

FIG. 2A

Clon 1G6

HVR-H1: GYSFTDYNMY (SEQ ID NO:164)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:167)
HVR-H3: ASPNYYDSSPFAY (SEQ ID NO:170)
HVR-L1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:155)
HVR-L2: TWIYDTSILAS (SEQ ID NO:158)
HVR-L3: QQWTSNPLT (SEQ ID NO:161)

Clon 6G1

HVR-H1: GYVFTHYNMY (SEQ ID NO:165)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:168)
HVR-H3: ARGQGPDPFDV (SEQ ID NO:171)
HVR-L1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:156)
HVR-L2: RWIYDTSKLAS (SEQ ID NO:159)
HVR-L3: QQWSSYPPT (SEQ ID NO:162)

Clon 15B2

HVR-H1: GYAFTSYNMY (SEQ ID NO:166)
HVR-H2: WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:169)
HVR-H3: ARWGDYDVGAMDY (SEQ ID NO:172)
HVR-L1: LASQTIGTWLA (SEQ ID NO:157)
HVR-L2: LLIYAATSLAD (SEQ ID NO:160)
HVR-L3: QQLYSPPWTT (SEQ ID NO:163)

FIG. 2B

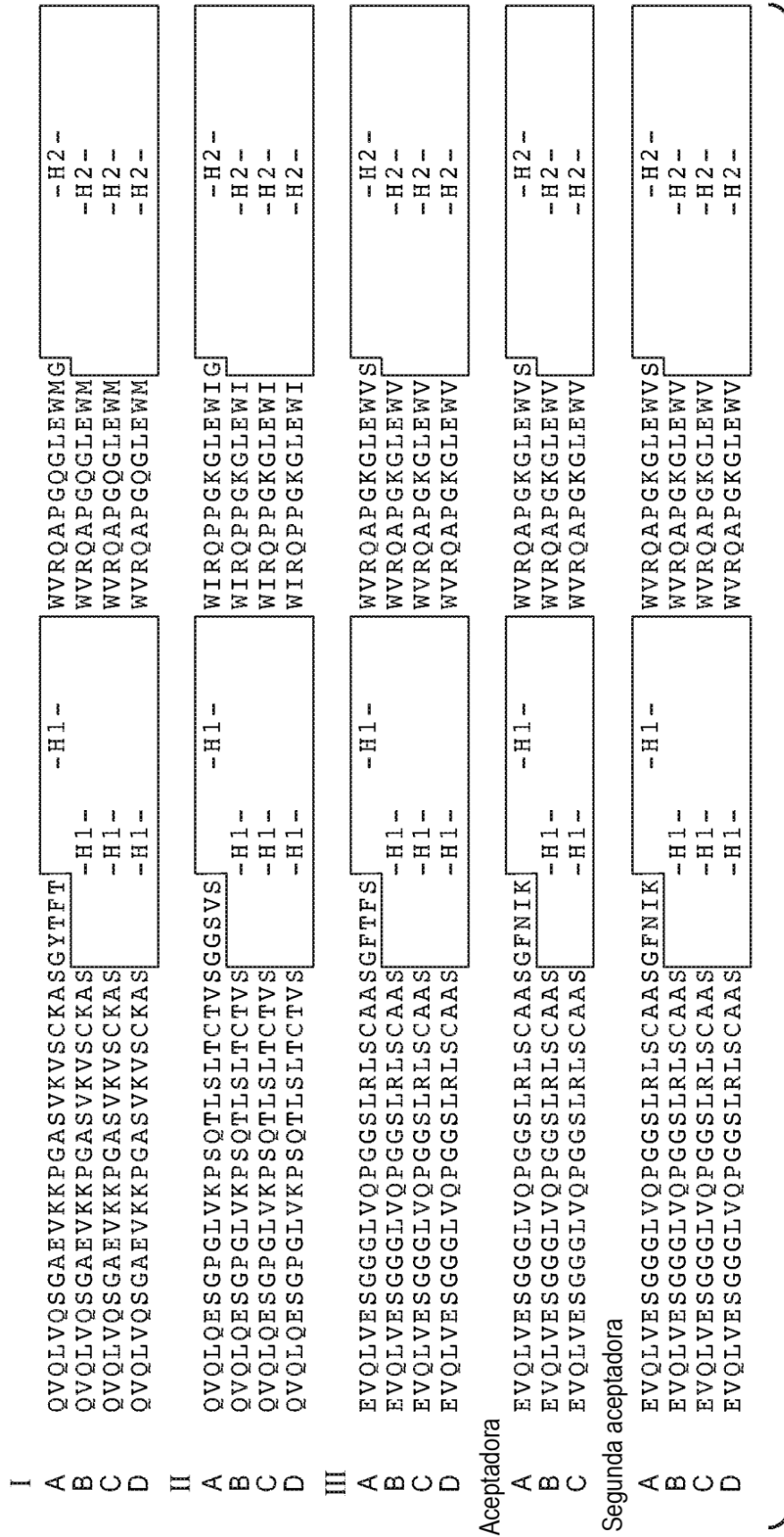


FIG. 3A

FIG. 3B

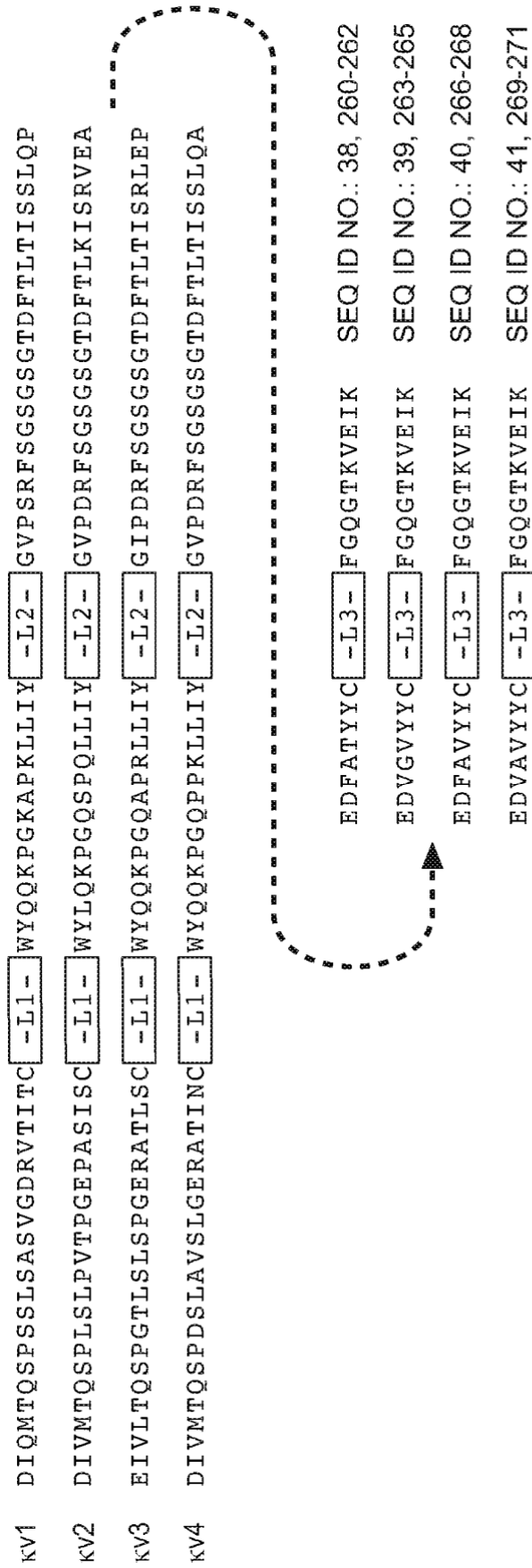


FIG. 4

Secuencias de armazón de cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Secuencias de armazón de cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 175)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 176)

FIG. 5**Secuencias de armazón de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificadas en la posición 66 (subrayada)**

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 177)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Secuencias de armazón de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificadas en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 178)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 176)

FIG. 6

FIG. 7A

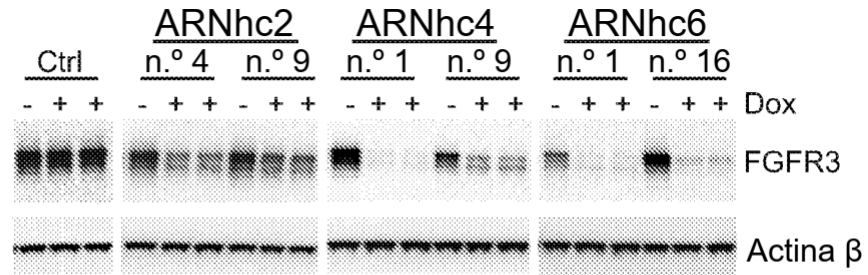


FIG. 7B

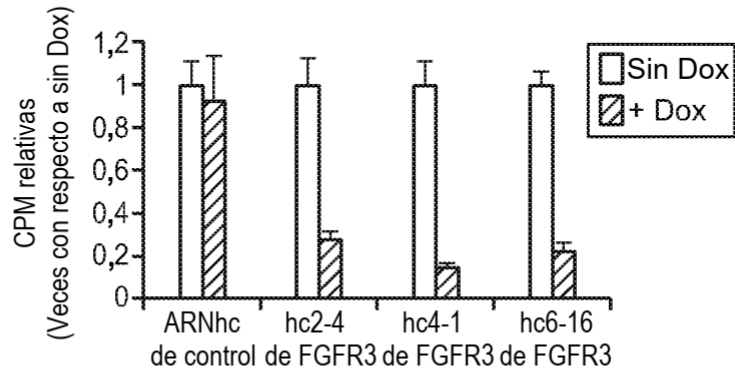
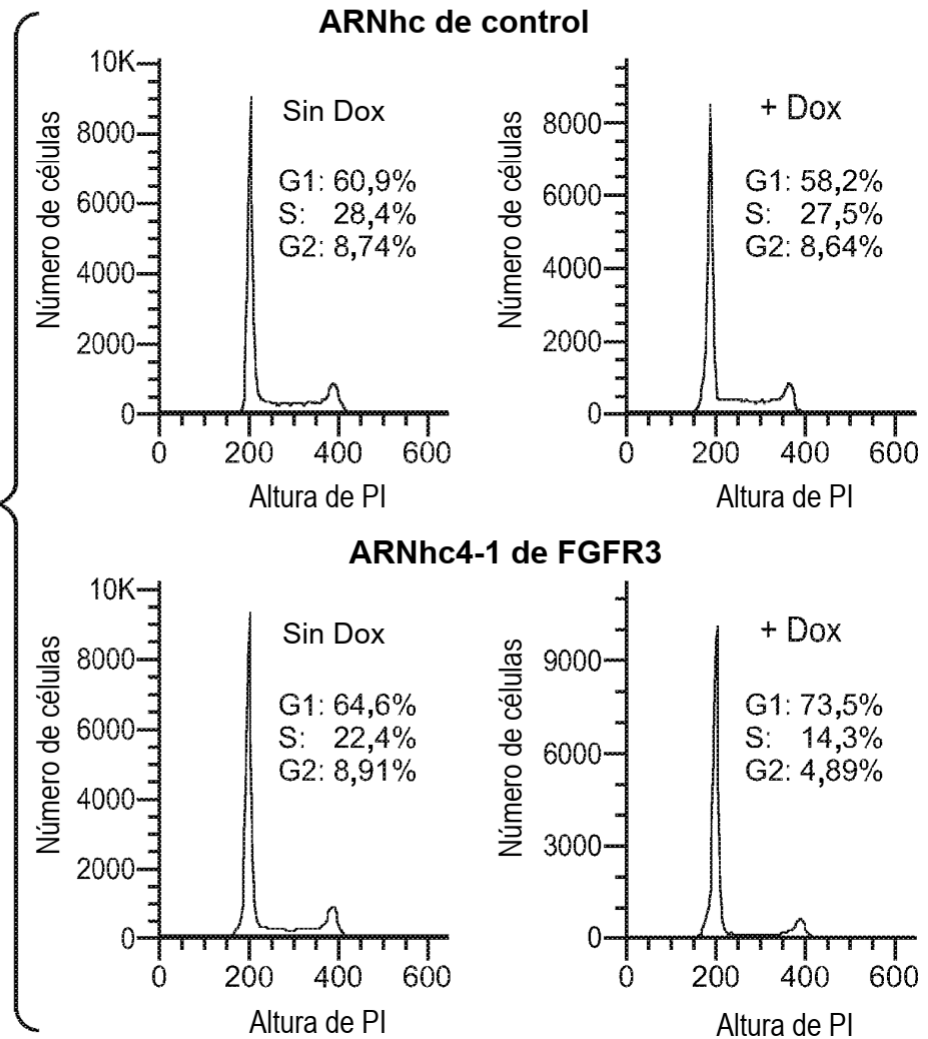


FIG. 7C



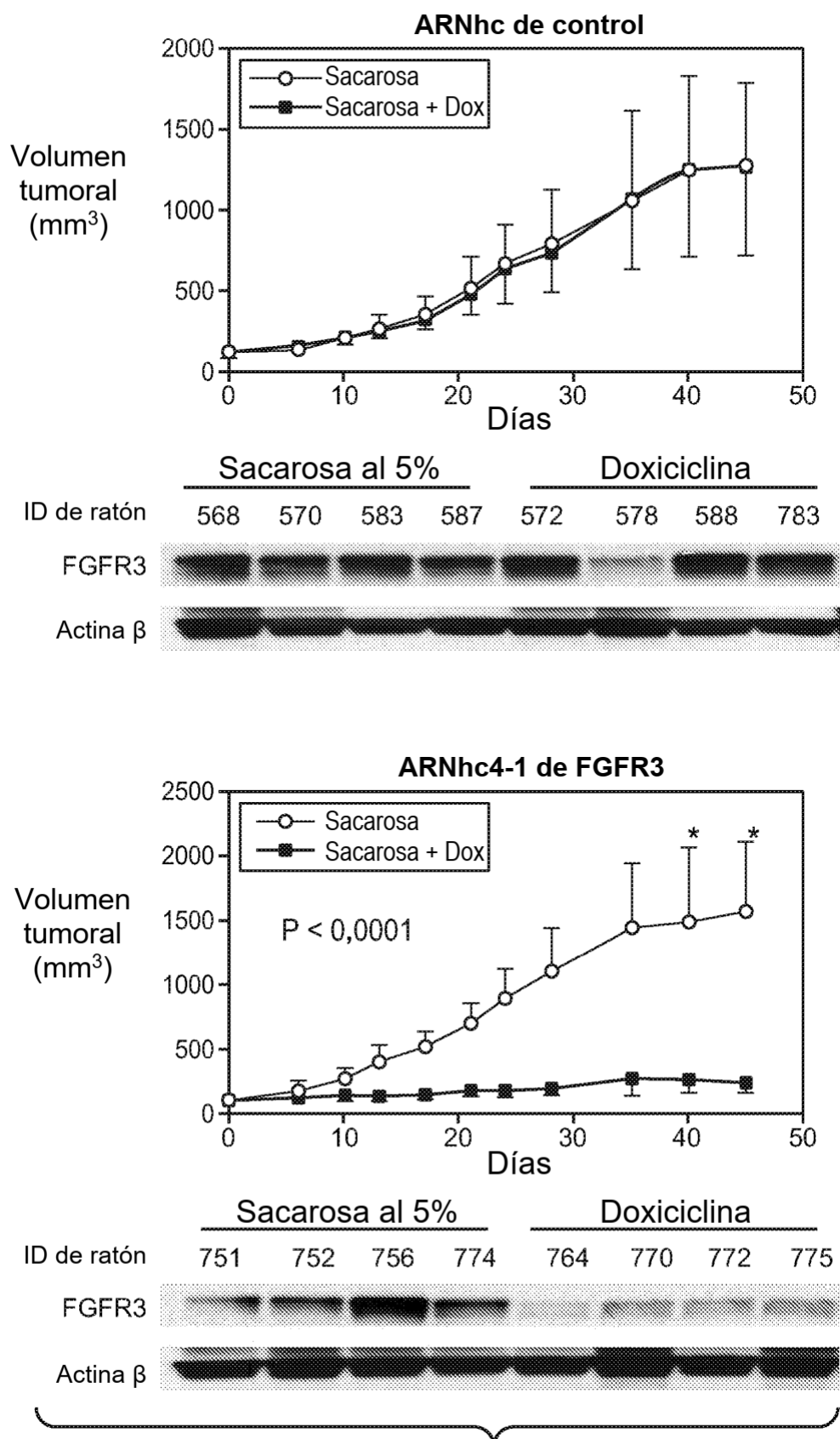
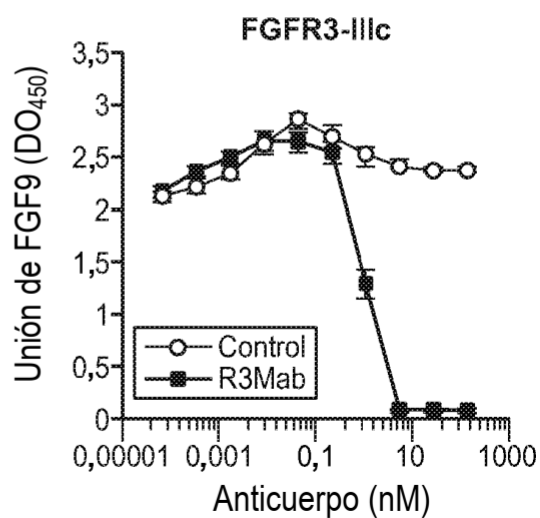
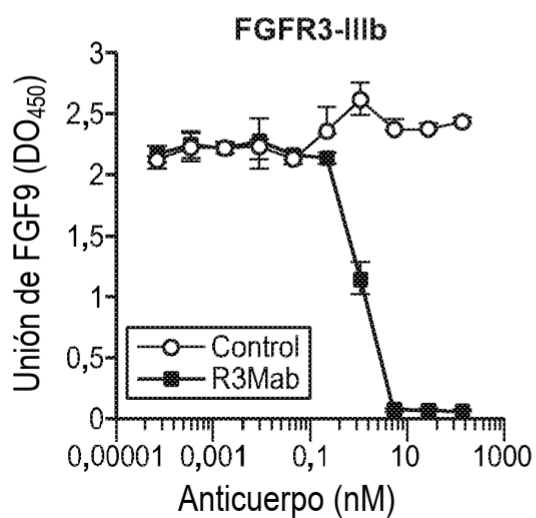
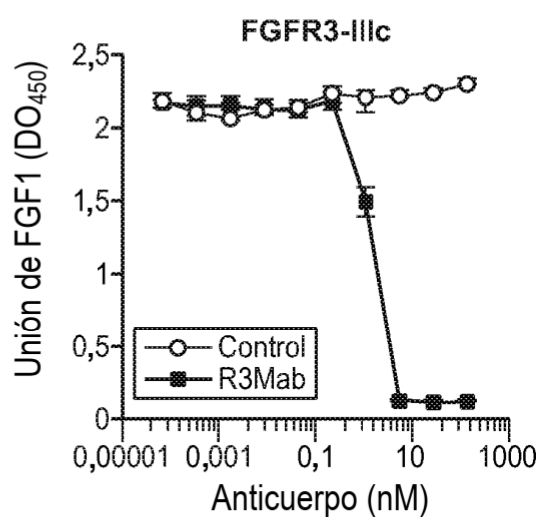
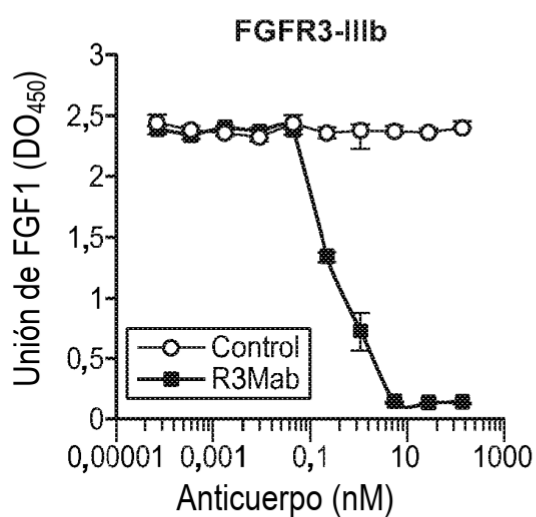
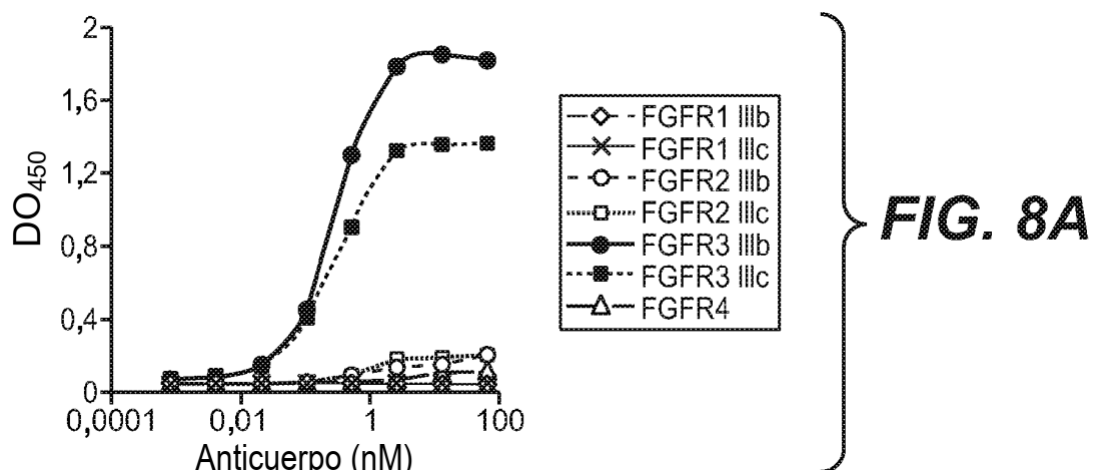


FIG. 7D



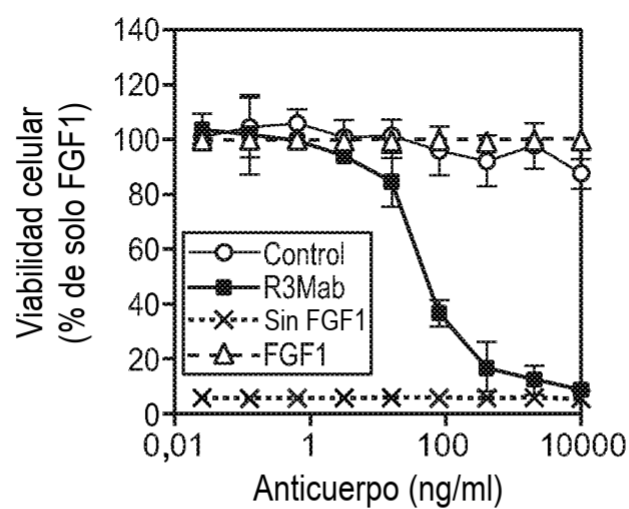


FIG. 9A

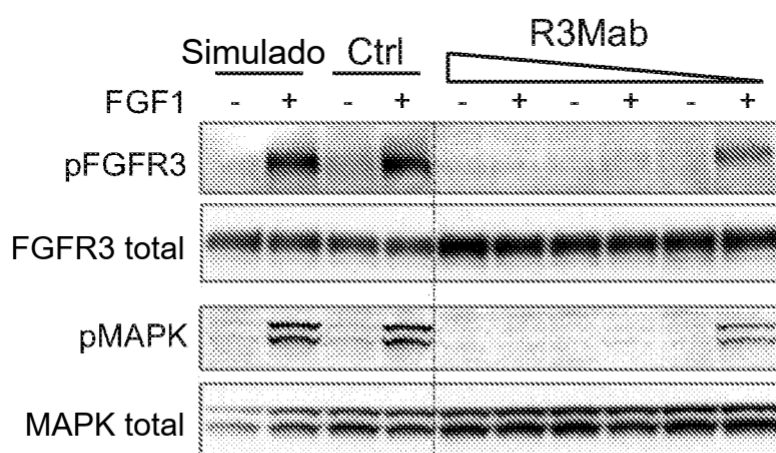


FIG. 9B

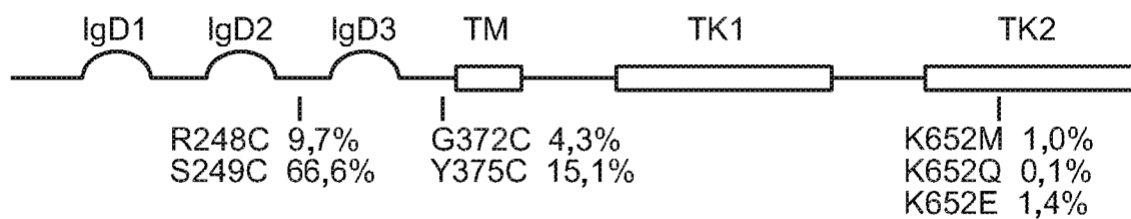


FIG. 9C

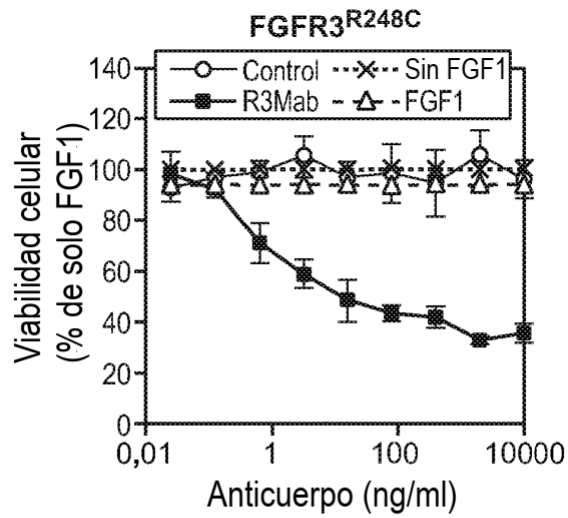


FIG. 9D

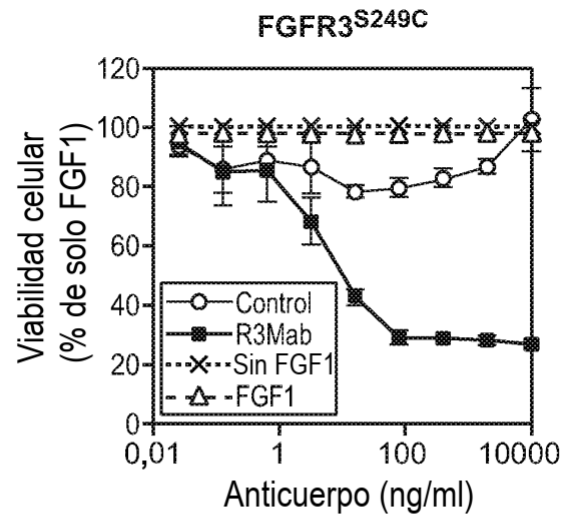


FIG. 9E

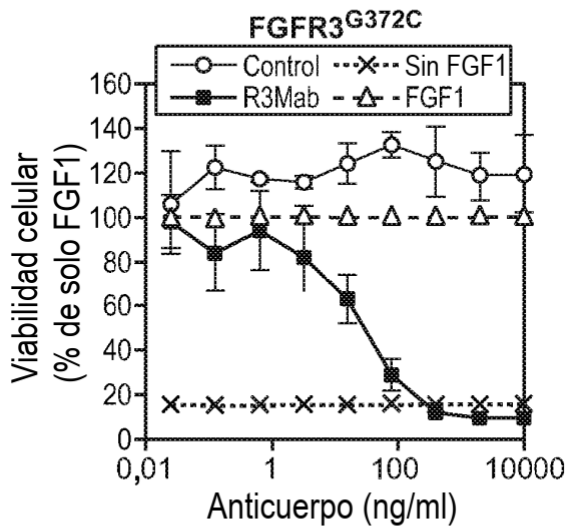


FIG. 9F

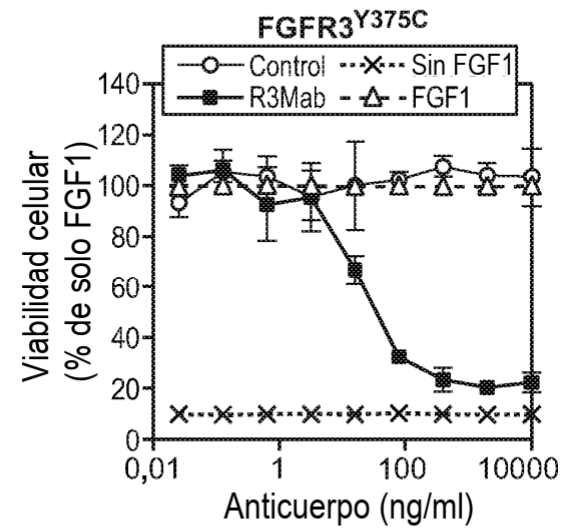


FIG. 9G

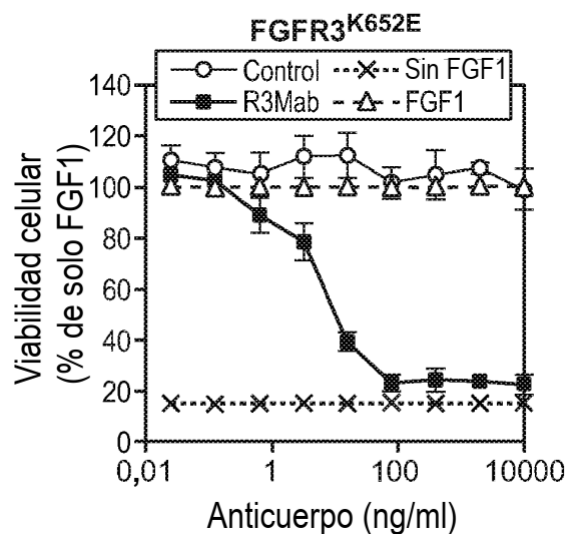
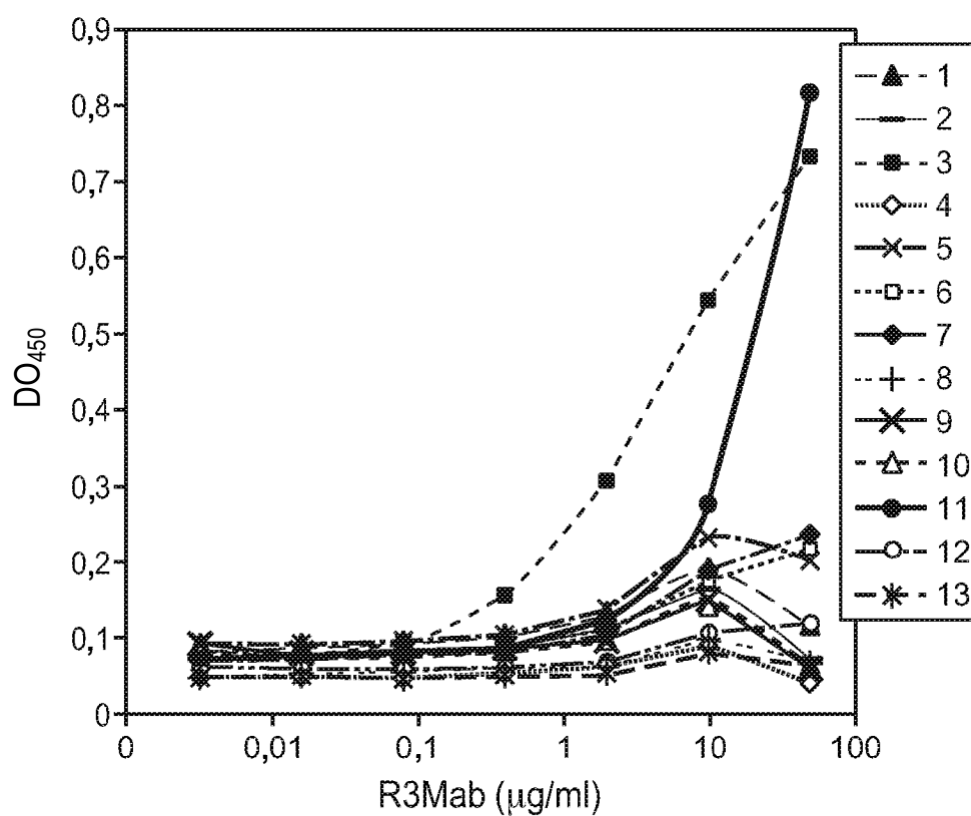


FIG. 9H

**FIG. 10A**

164	178	
FGFR3	LAVPAANTVRFRCPA	Péptido 3
FGFR1	HAVPAAKTVKFKCPS	
269	283	
FGFR3	SDVEFHCKVYSDAQP	Péptido 11
FGFR1	SNVEFMCKVYSDPQP	

FIG. 10B

FIG. 10C

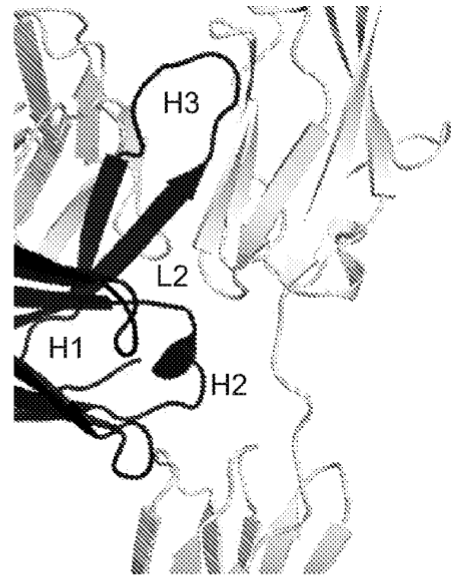
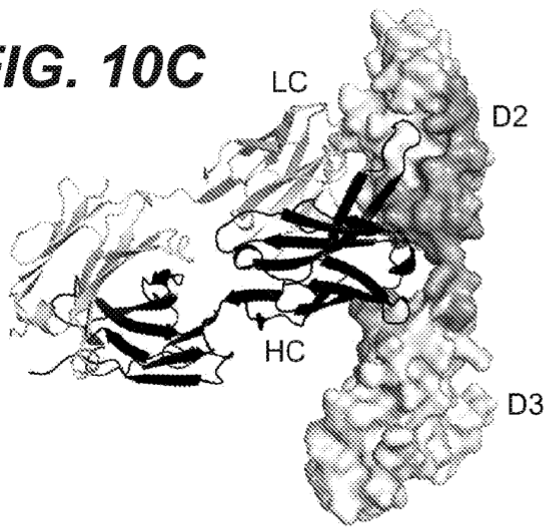


FIG. 10D

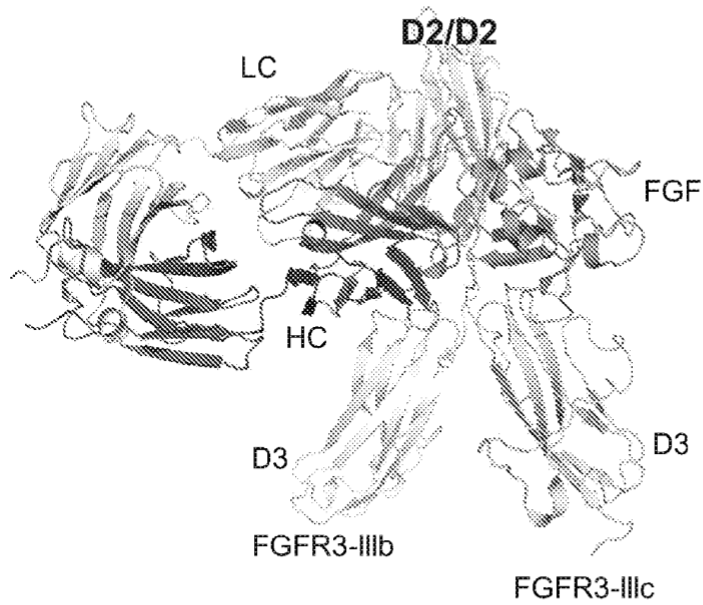


FIG. 10E

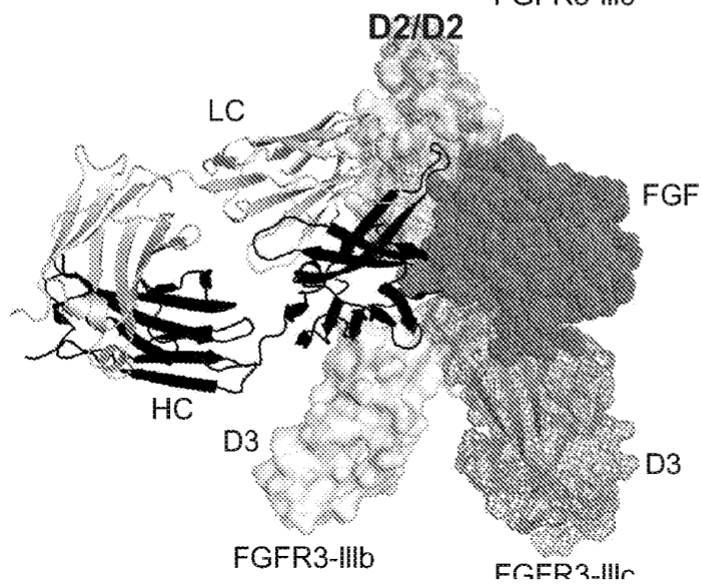


FIG. 10F

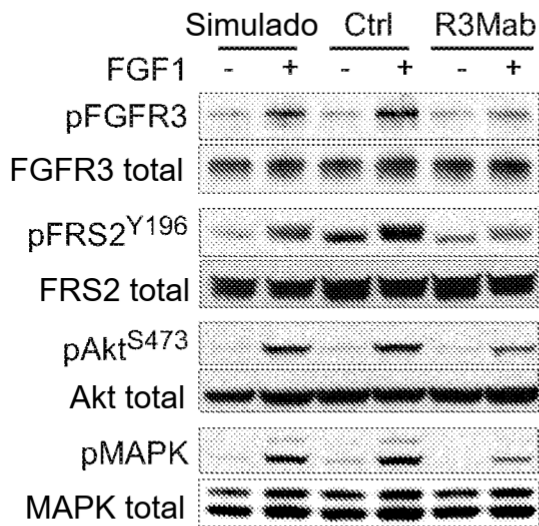
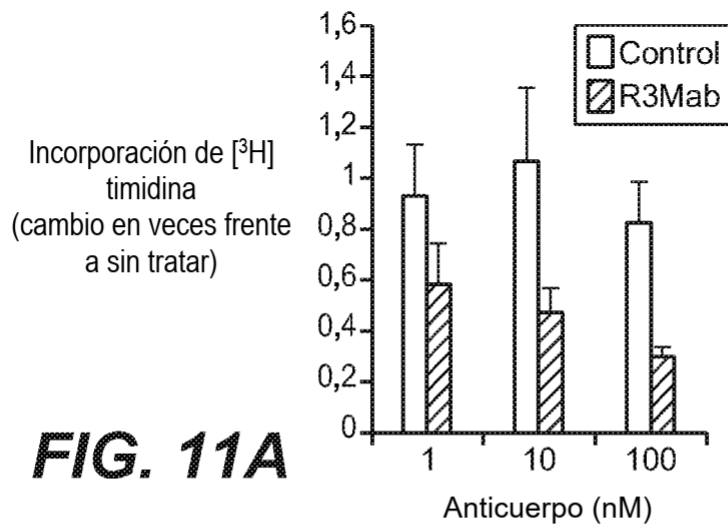


FIG. 11B

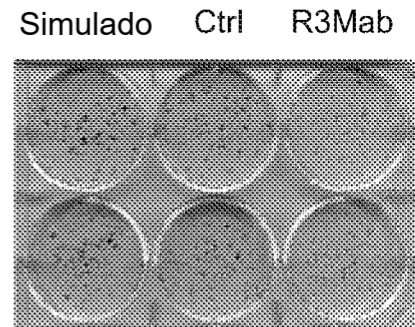


FIG. 11C

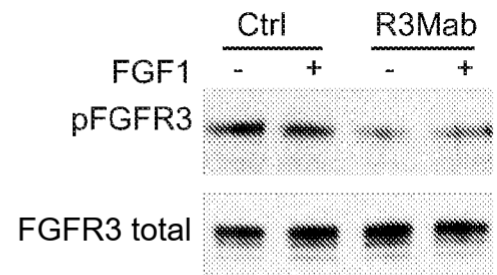
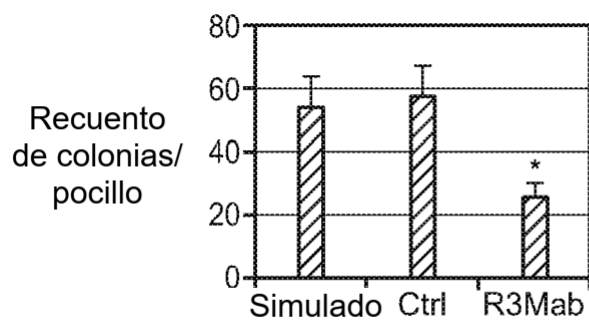


FIG. 11E

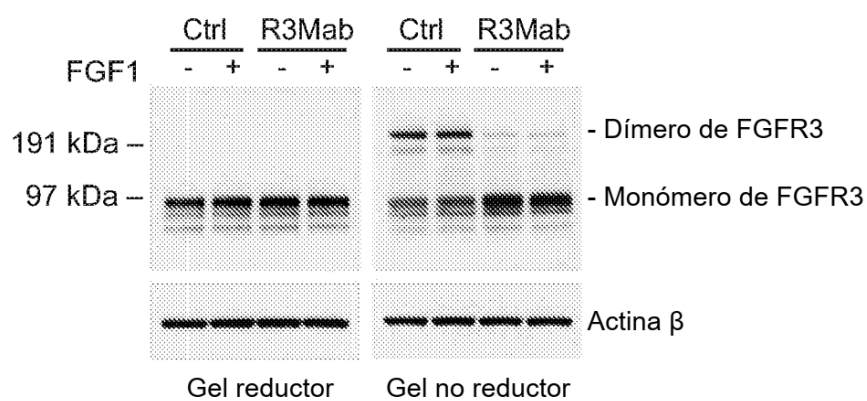


FIG. 12A

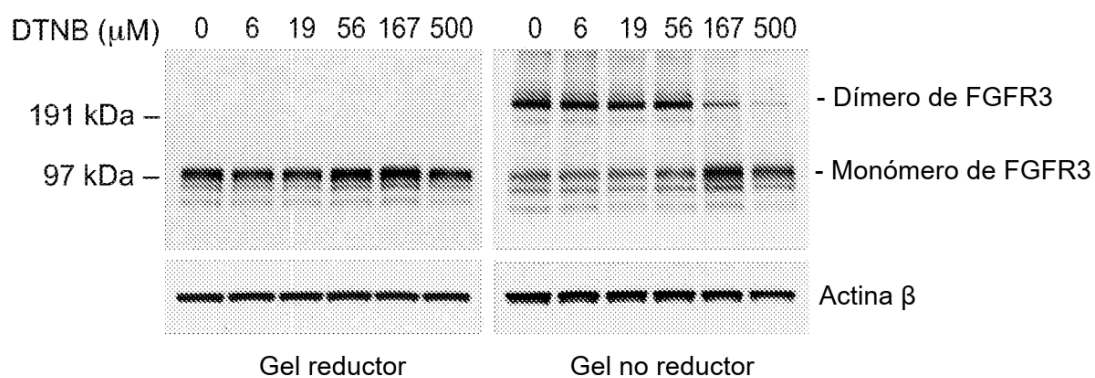


FIG. 12B

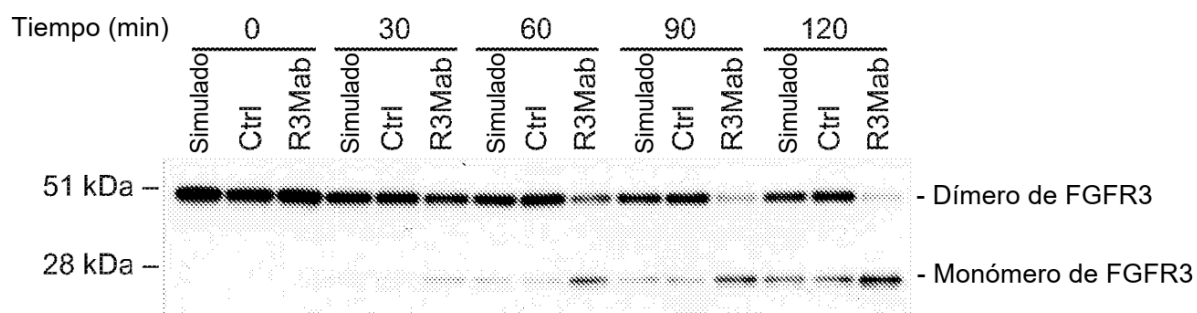


FIG. 12C

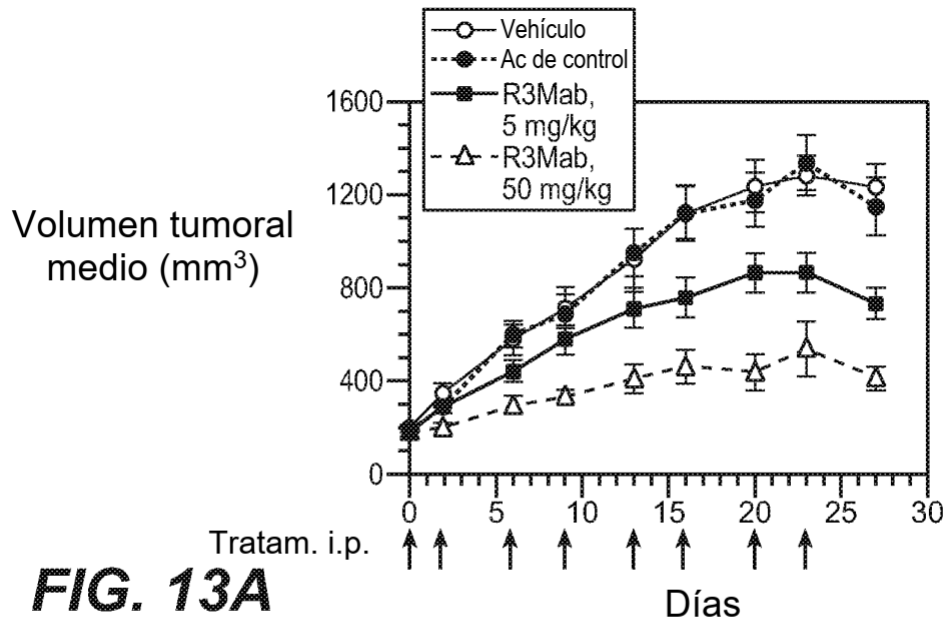


FIG. 13A

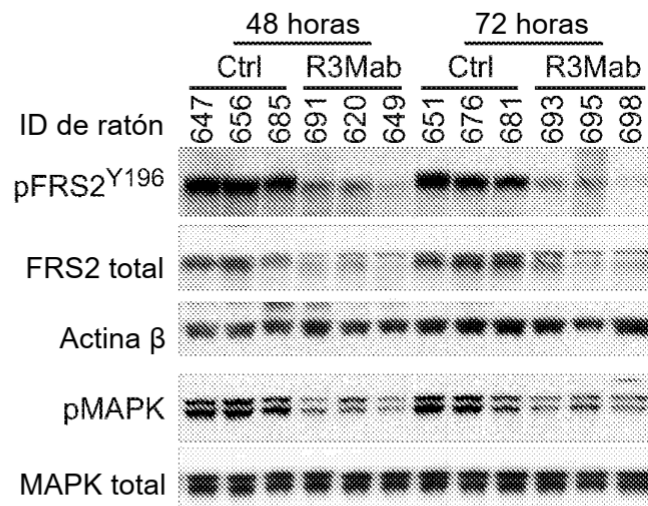


FIG. 13B

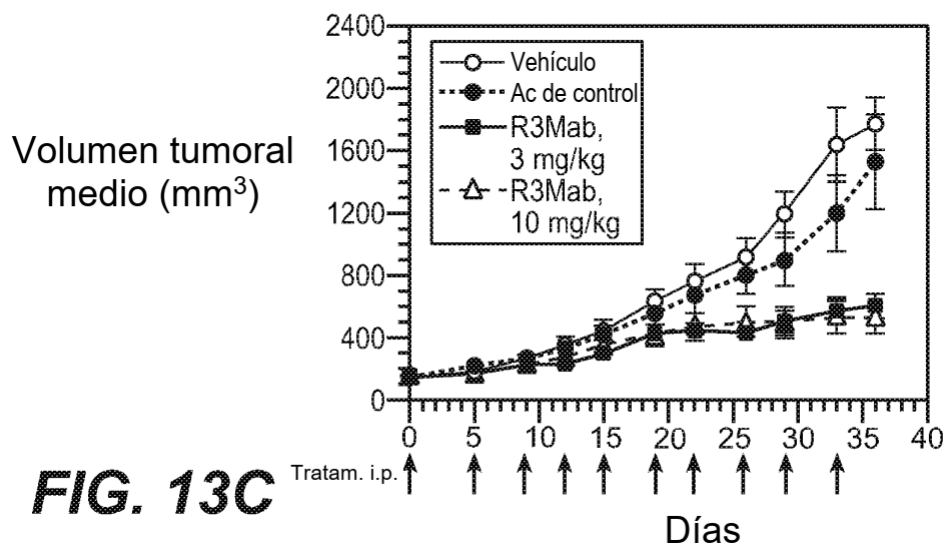
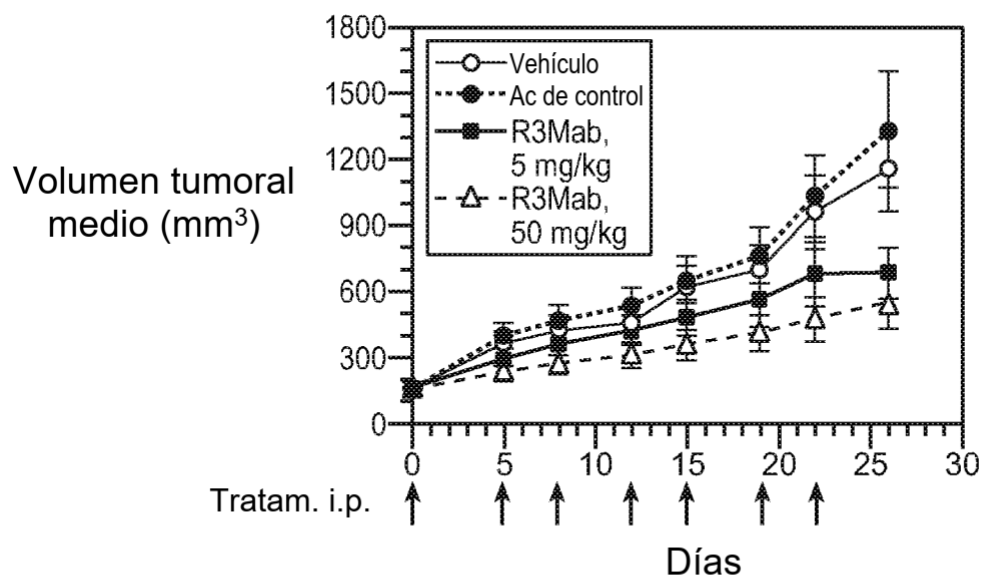
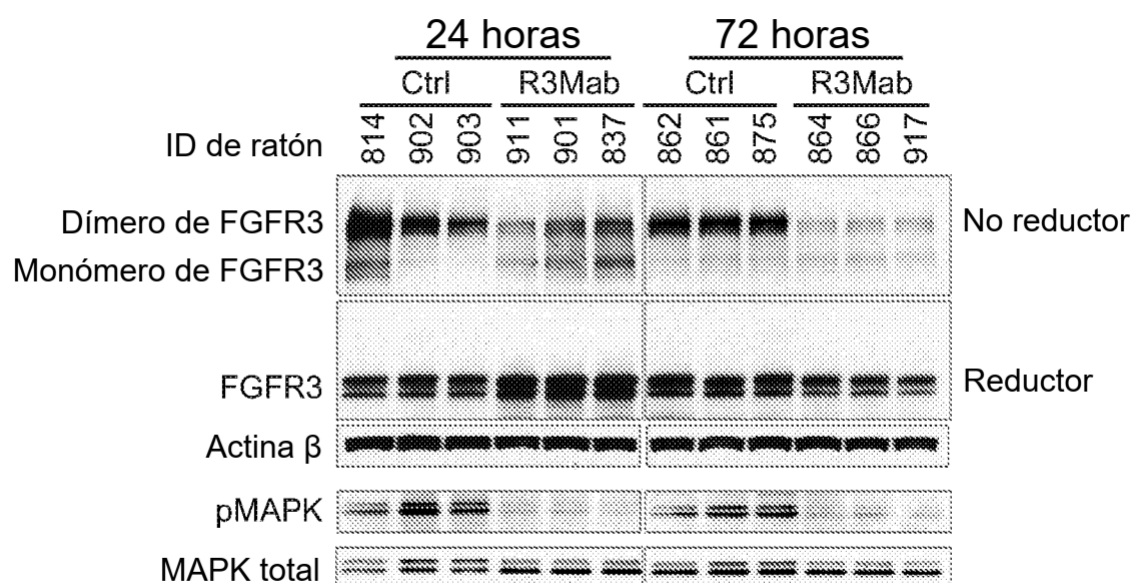
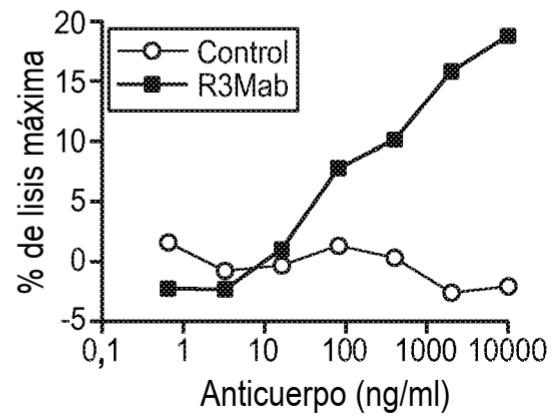
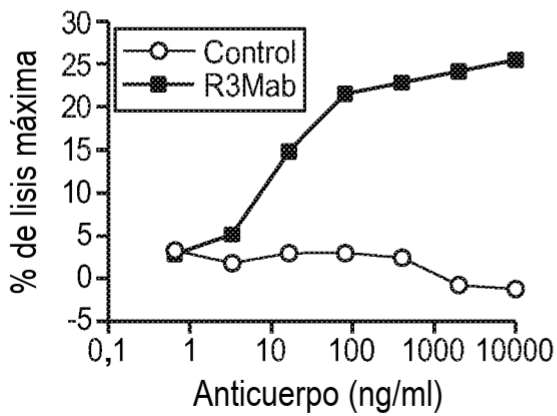
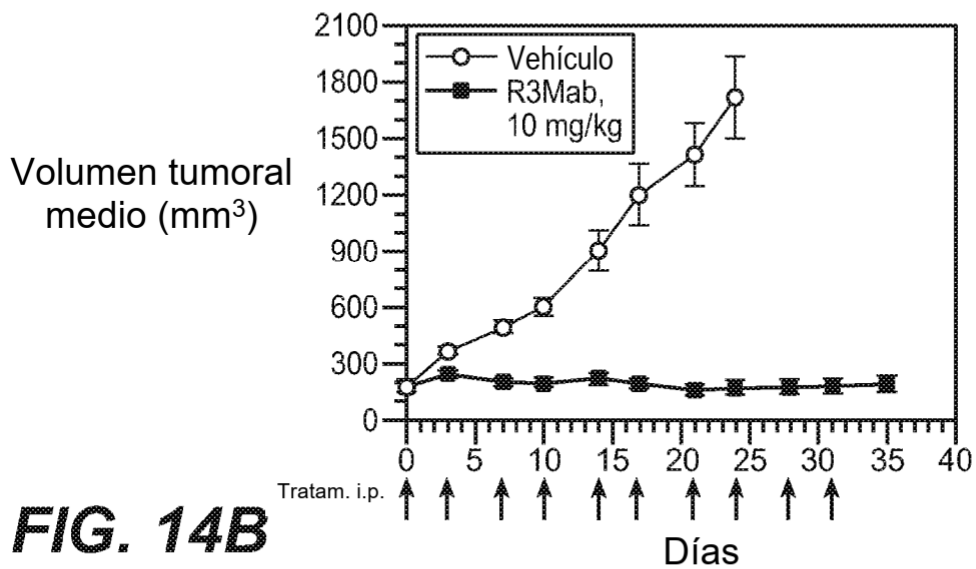
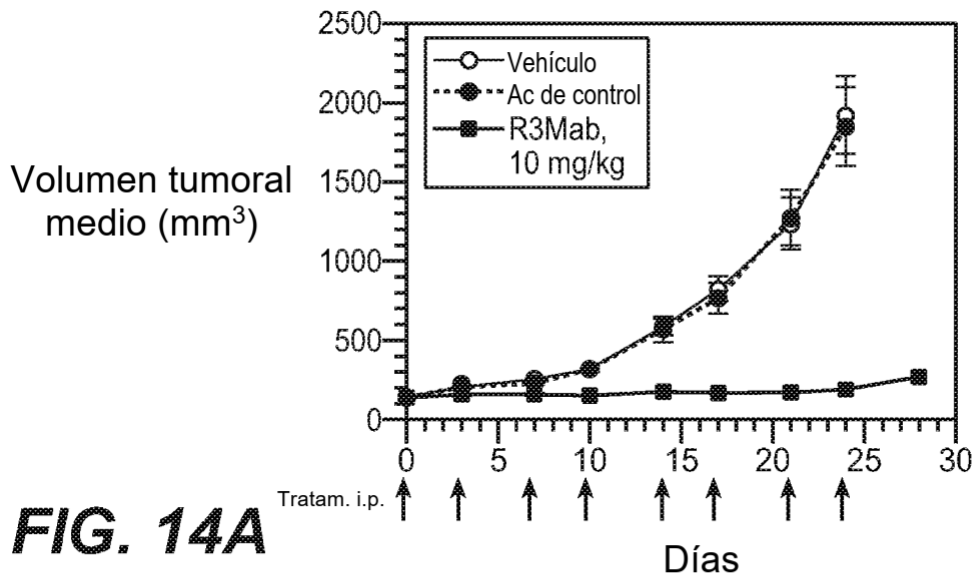


FIG. 13C

**FIG. 13D****FIG. 13E**



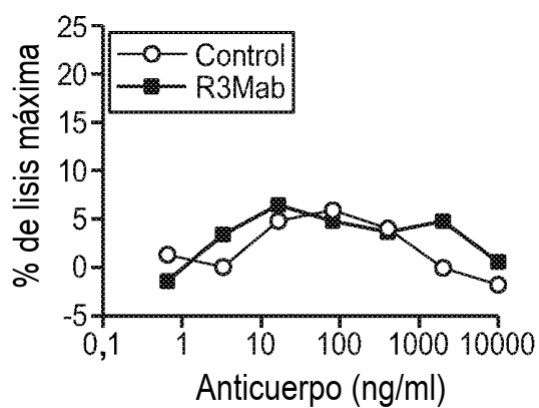


FIG. 14E

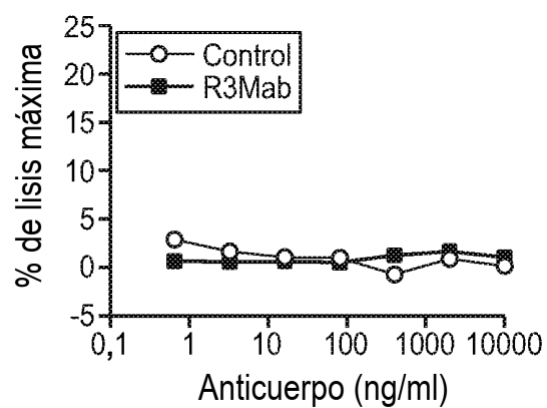


FIG. 14F

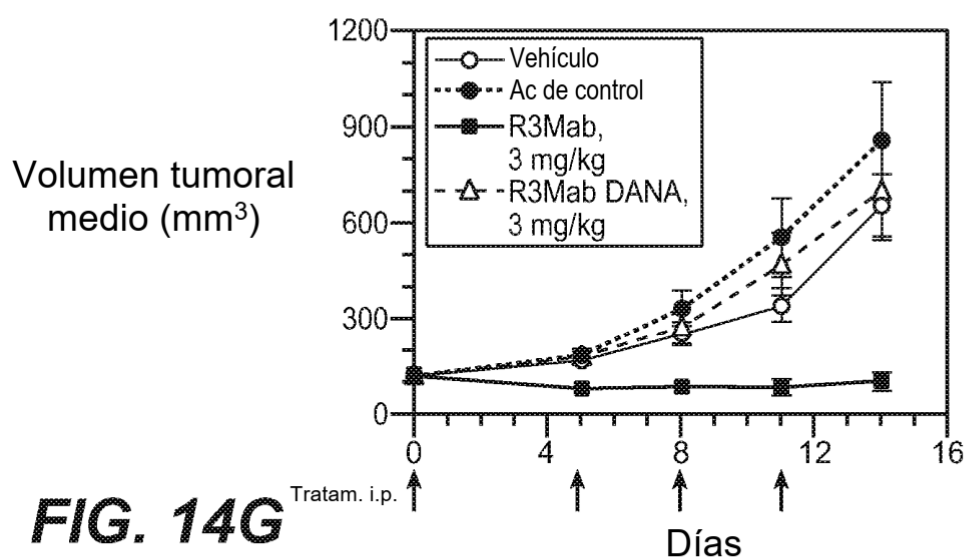


FIG. 14G

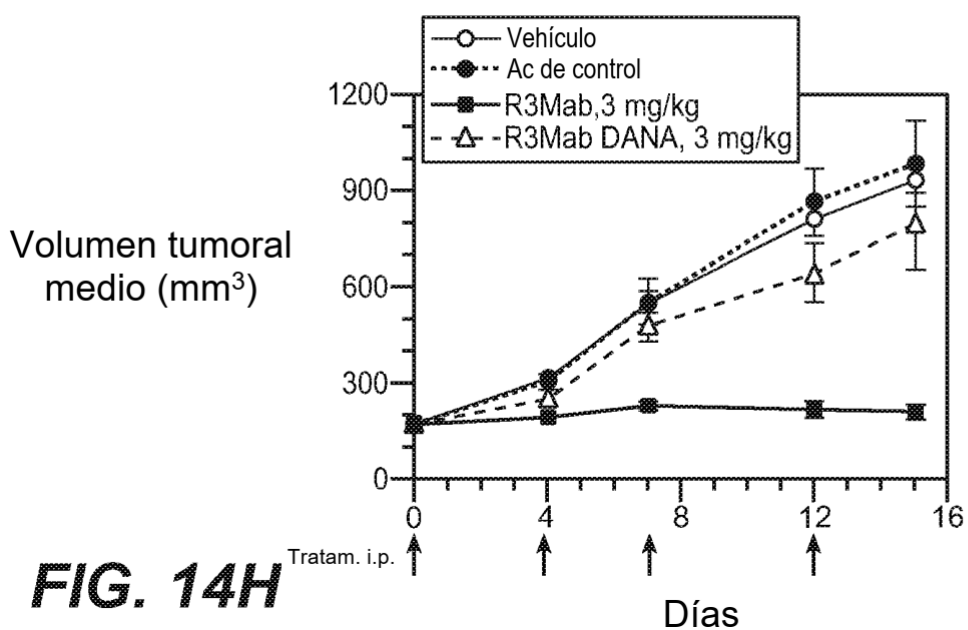
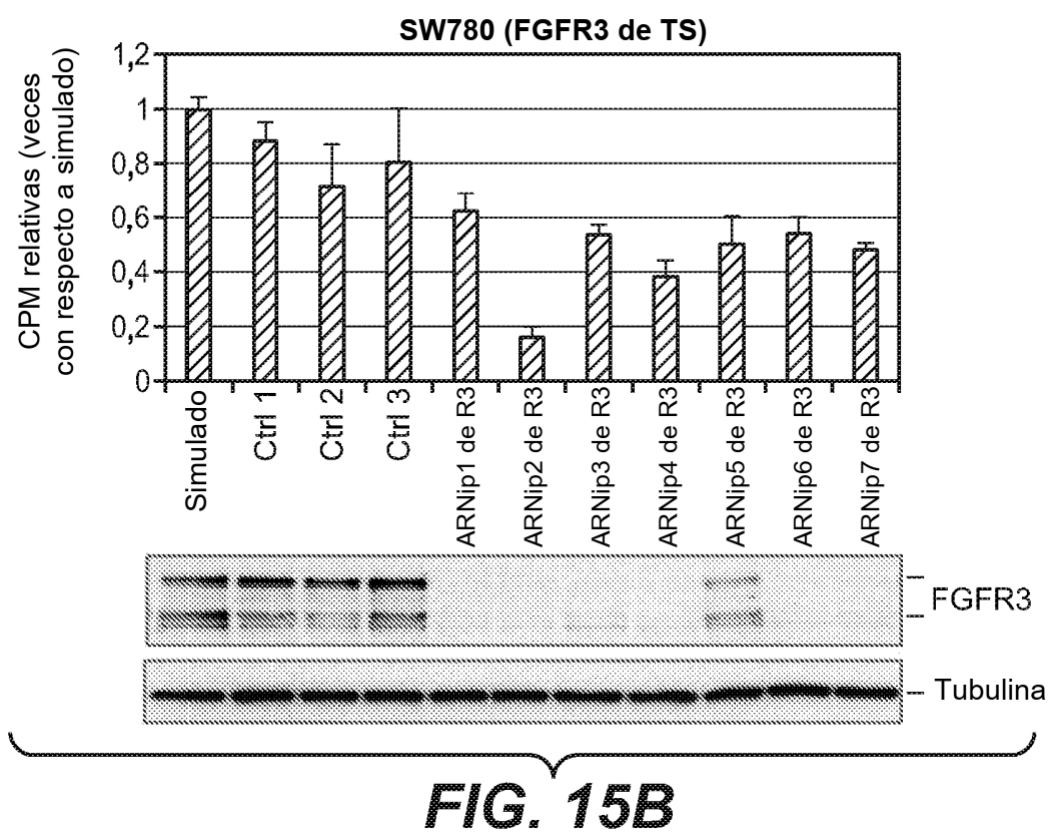
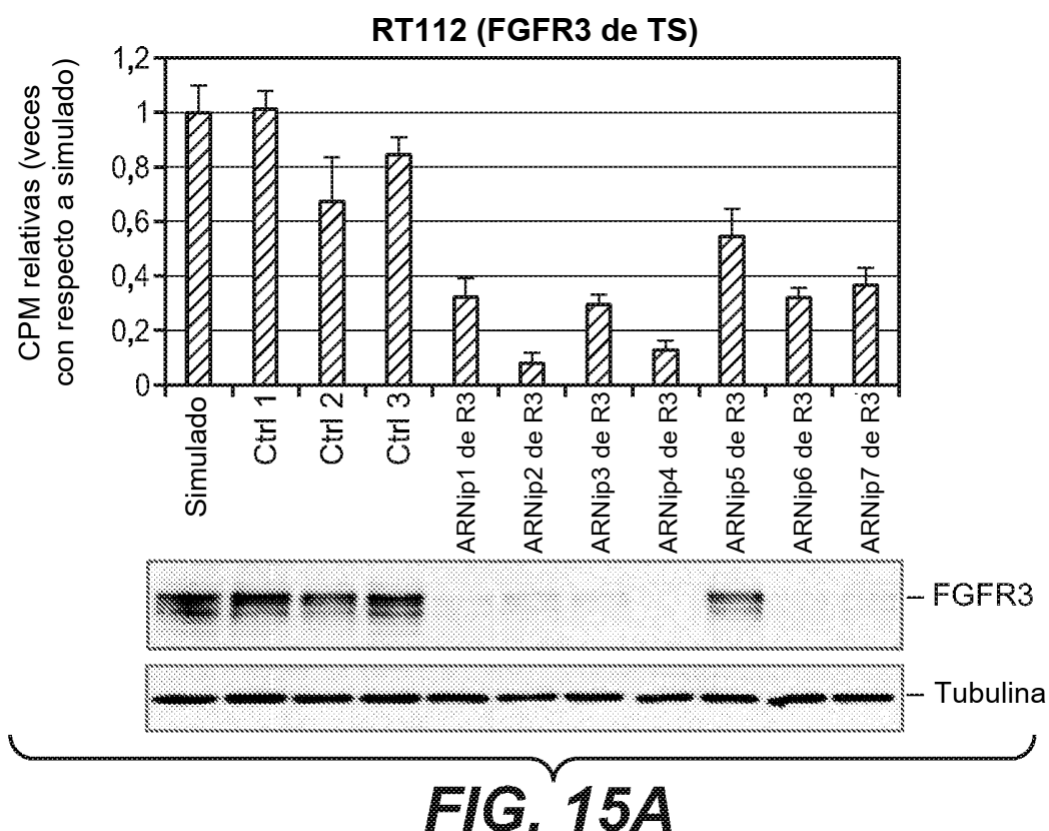


FIG. 14H



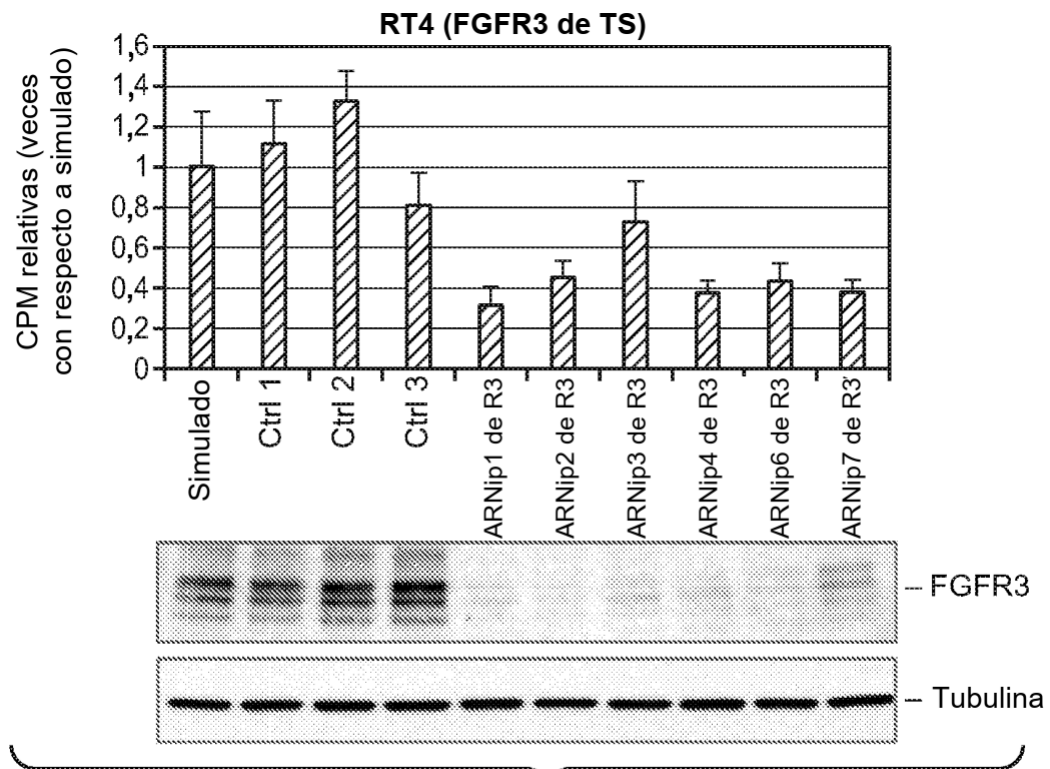


FIG. 15C

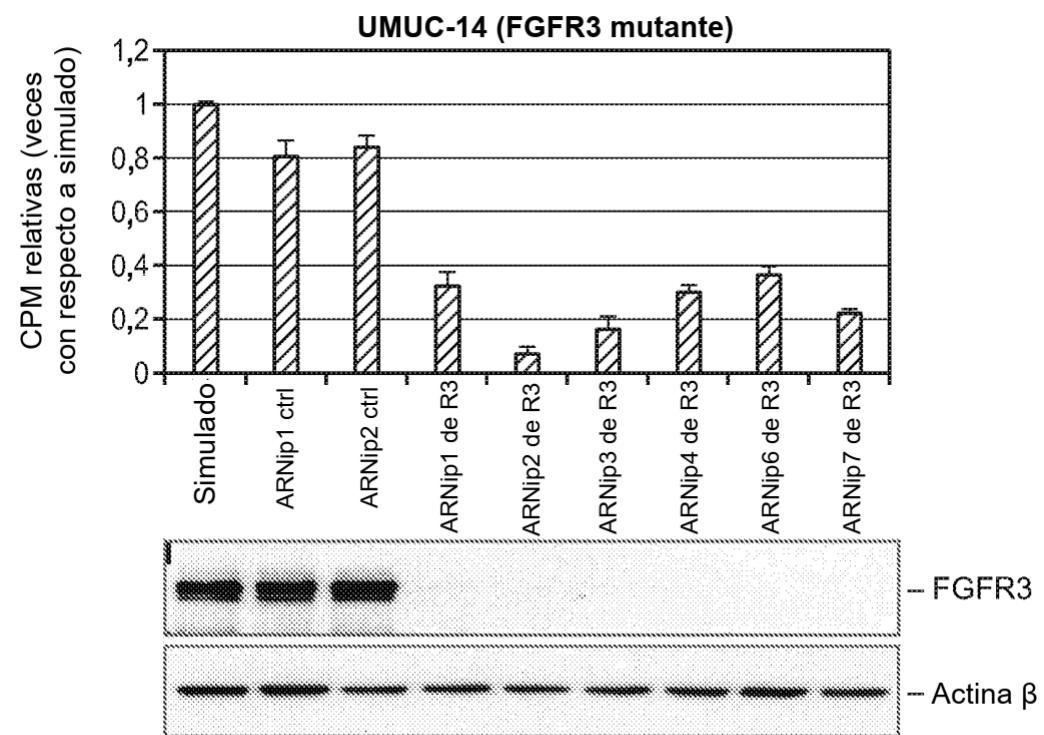
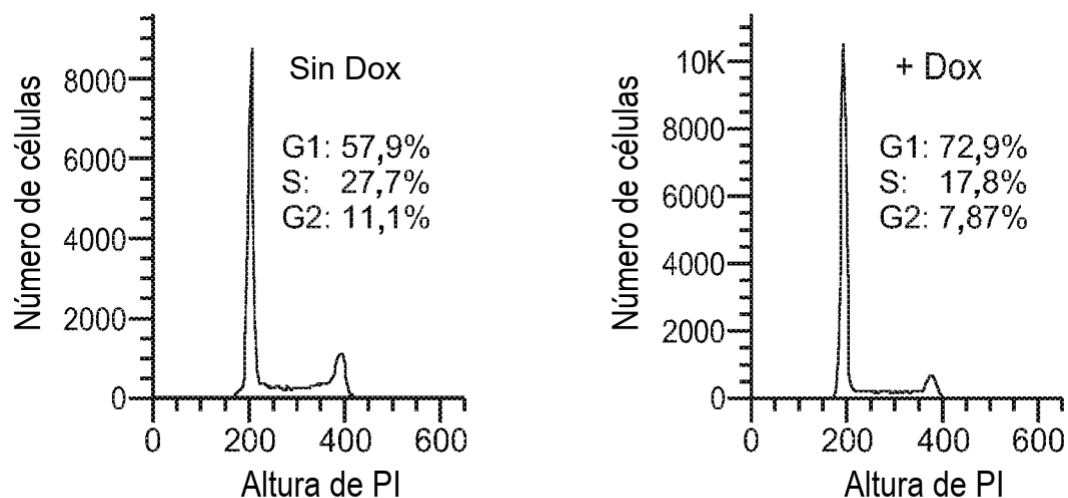


FIG. 15D

ARNhc2-4 de FGFR3



ARNhc6-16 de FGFR3

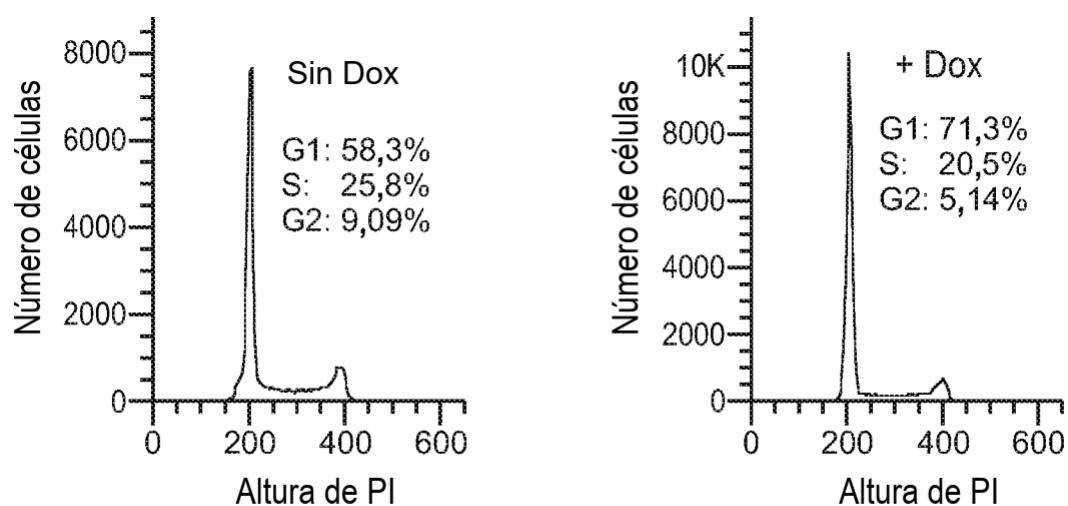


FIG. 16A

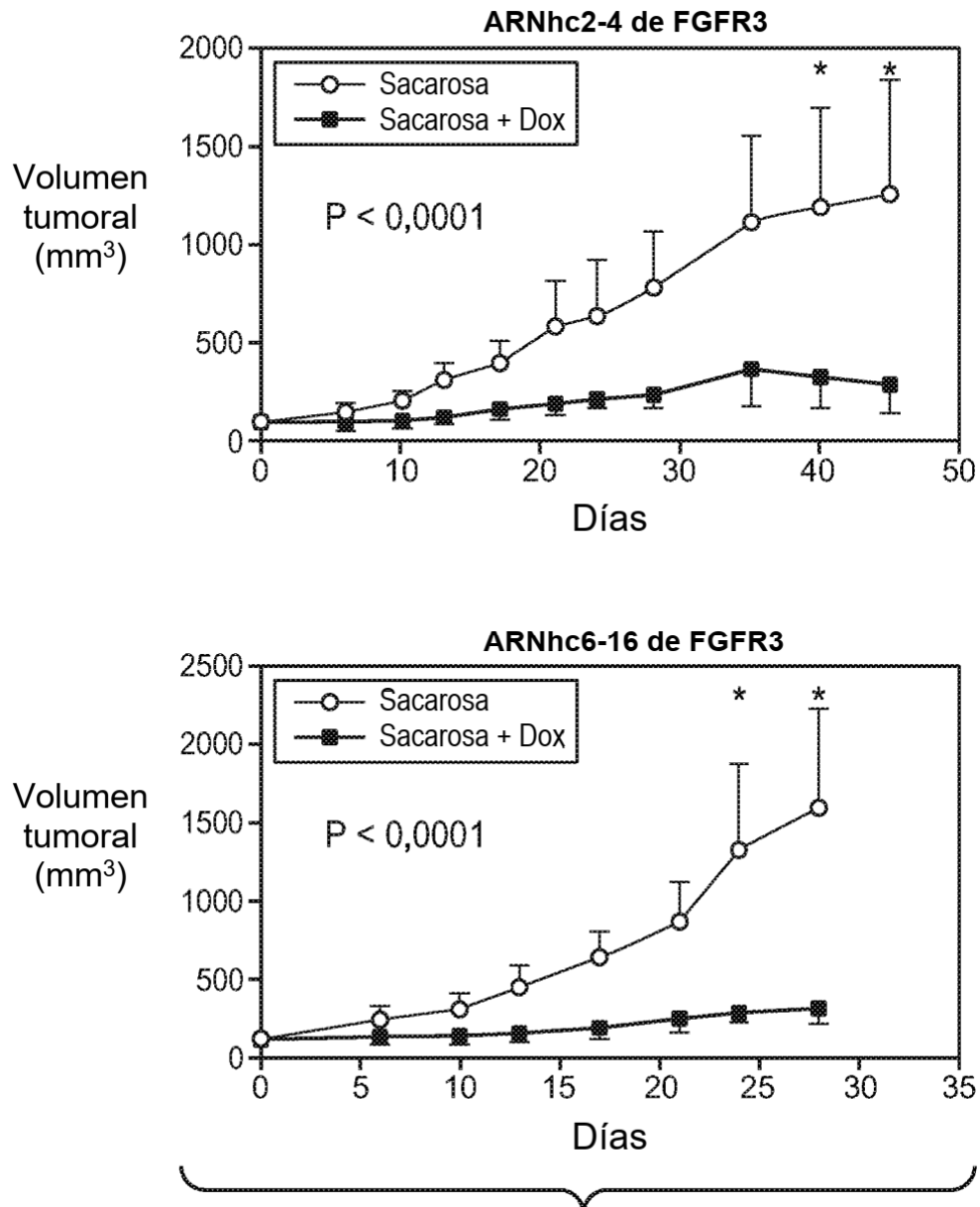
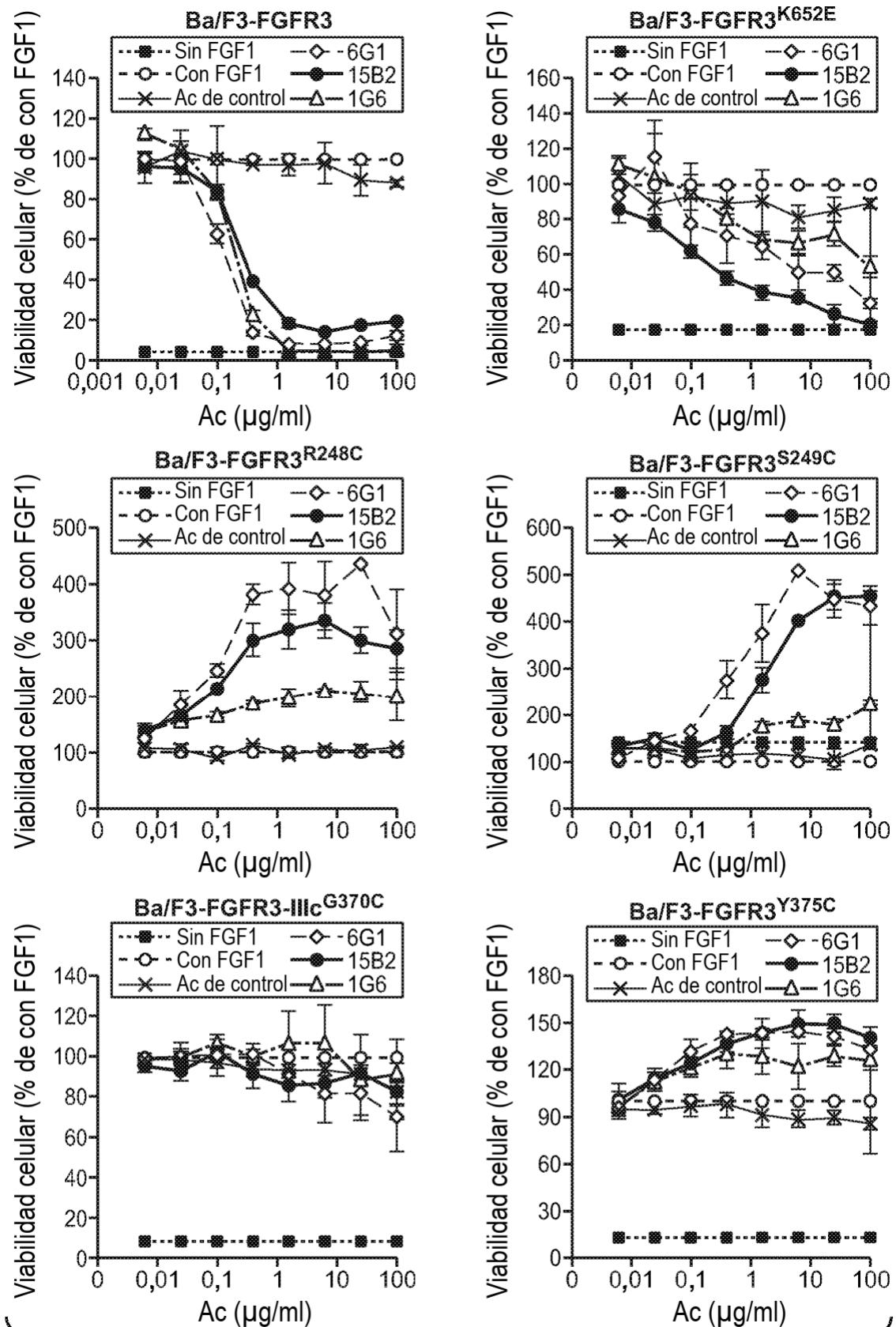
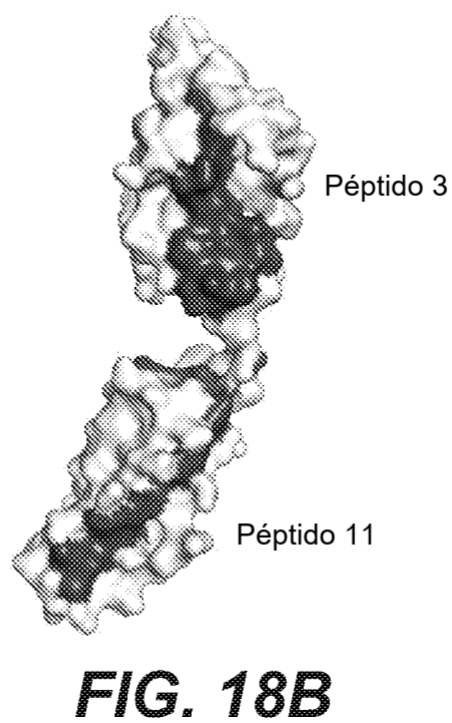
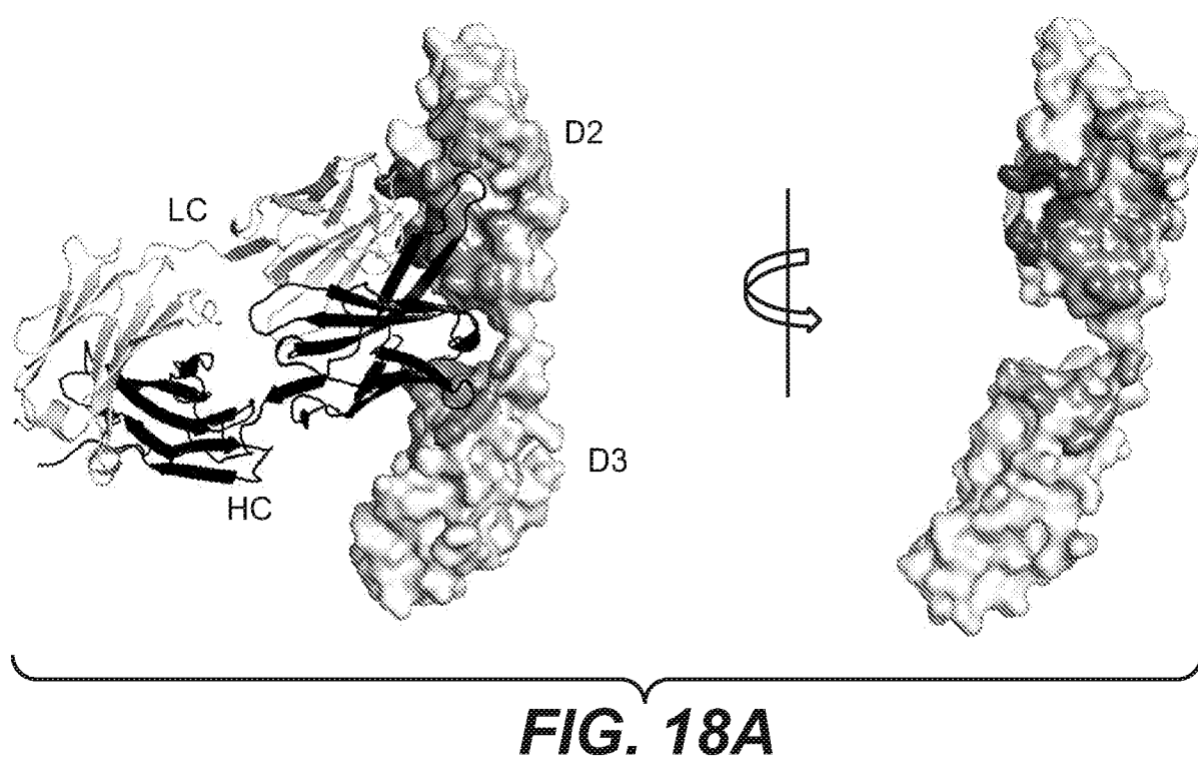


FIG. 16B

**FIG. 17**



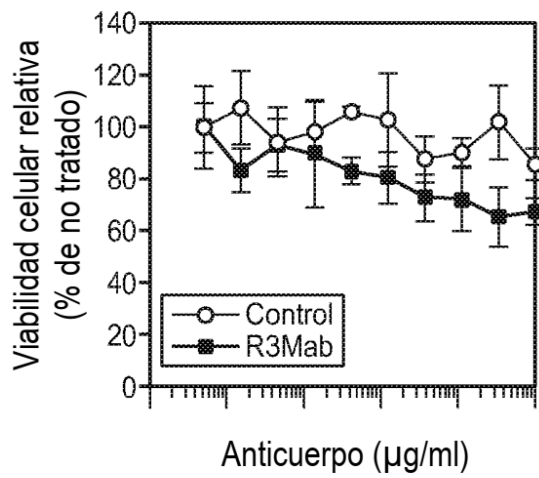


FIG. 19A

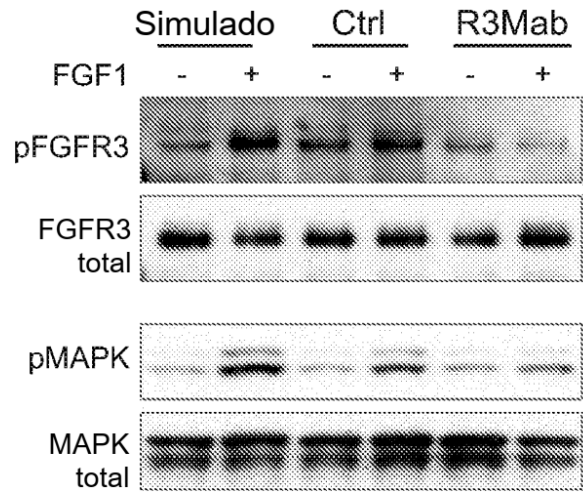


FIG. 19B

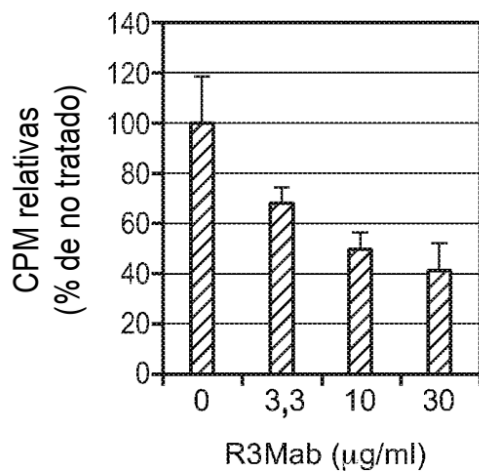


FIG. 19C

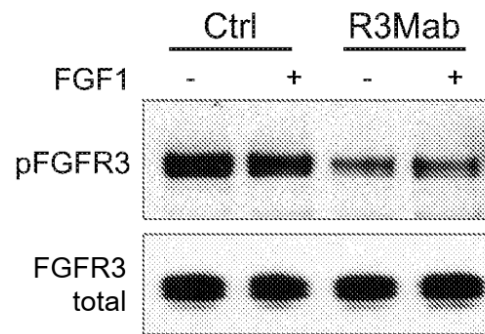


FIG. 19D

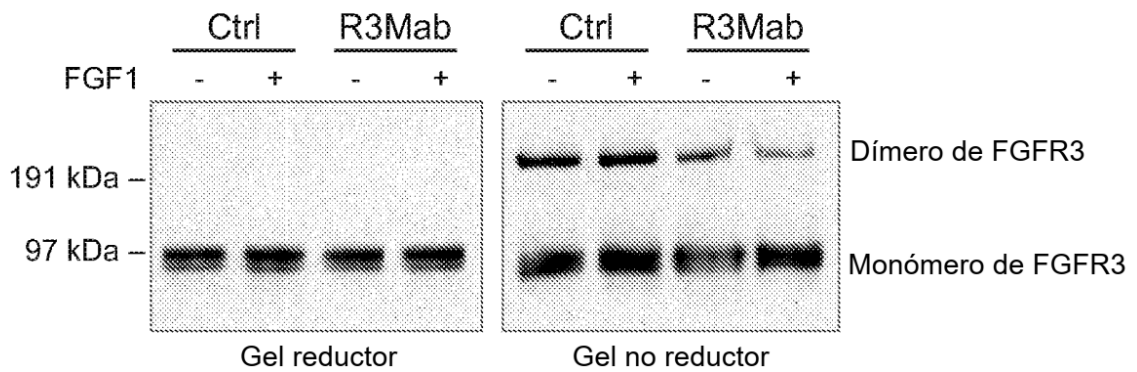


FIG. 19E

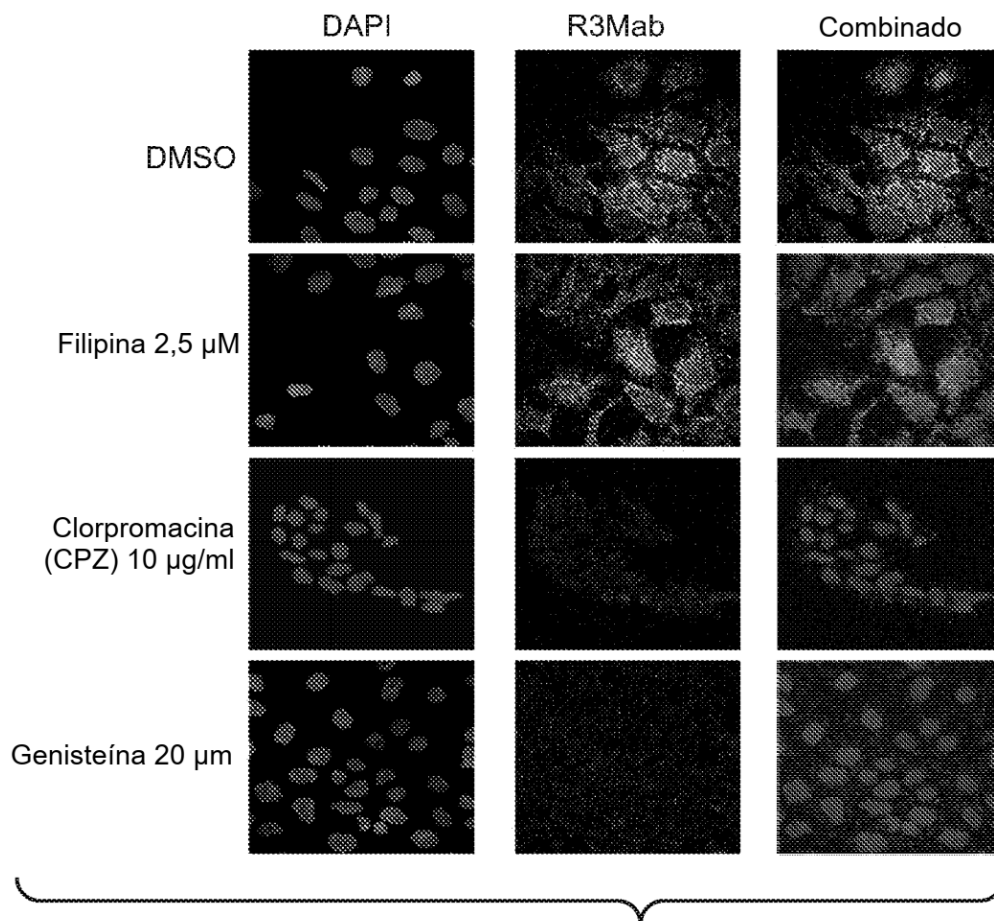


FIG. 20A

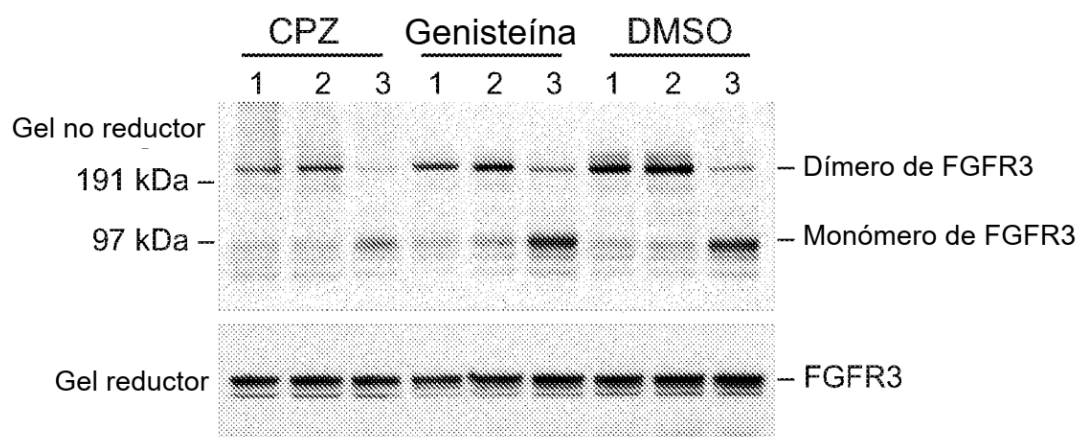


FIG. 20B

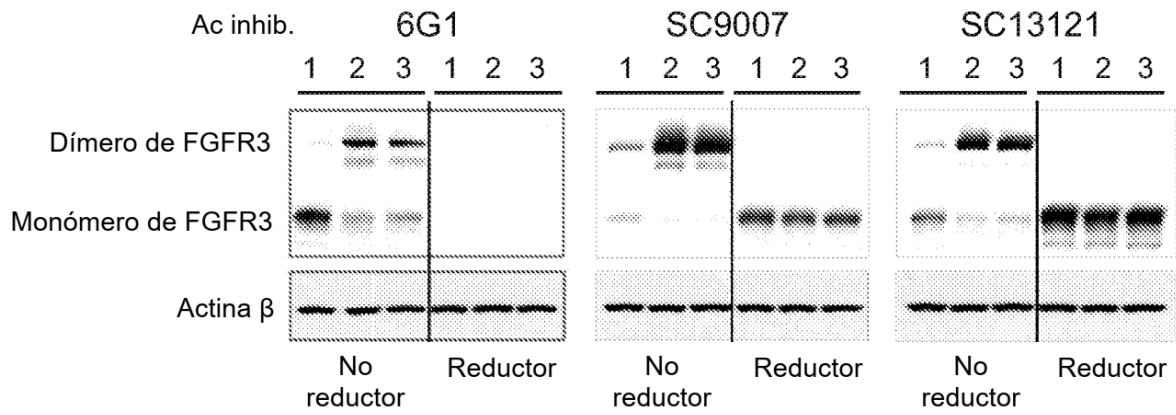
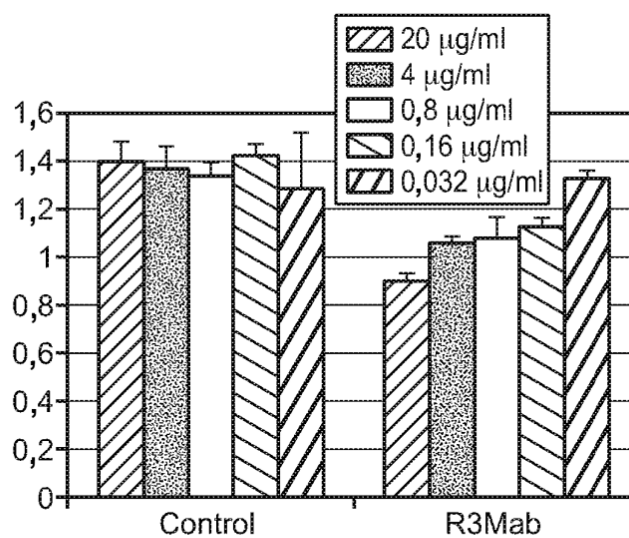


FIG. 21

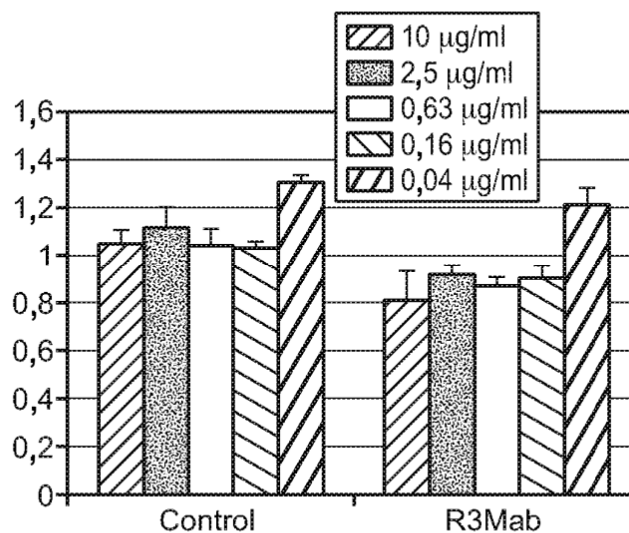
CPM relativas
(veces con respecto
a sin FGF9)

FIG. 22A



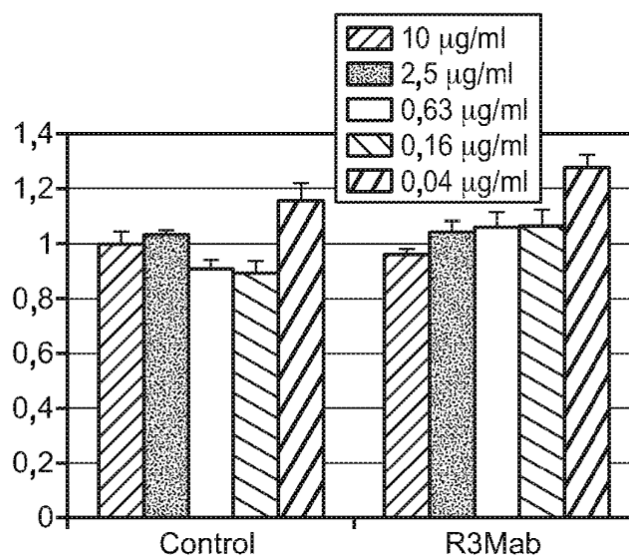
CPM relativas
(veces con respecto
a no tratado)

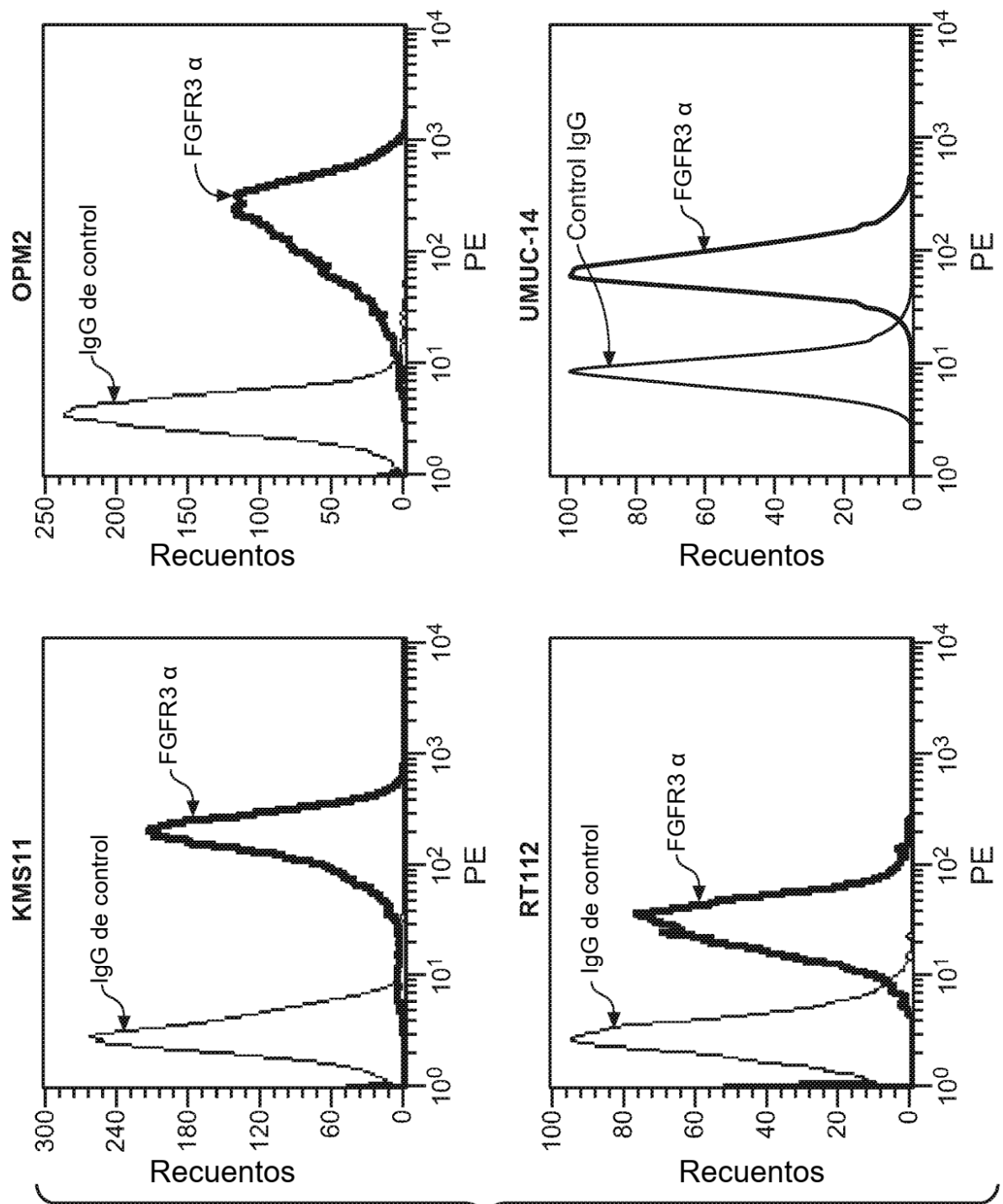
FIG. 22B

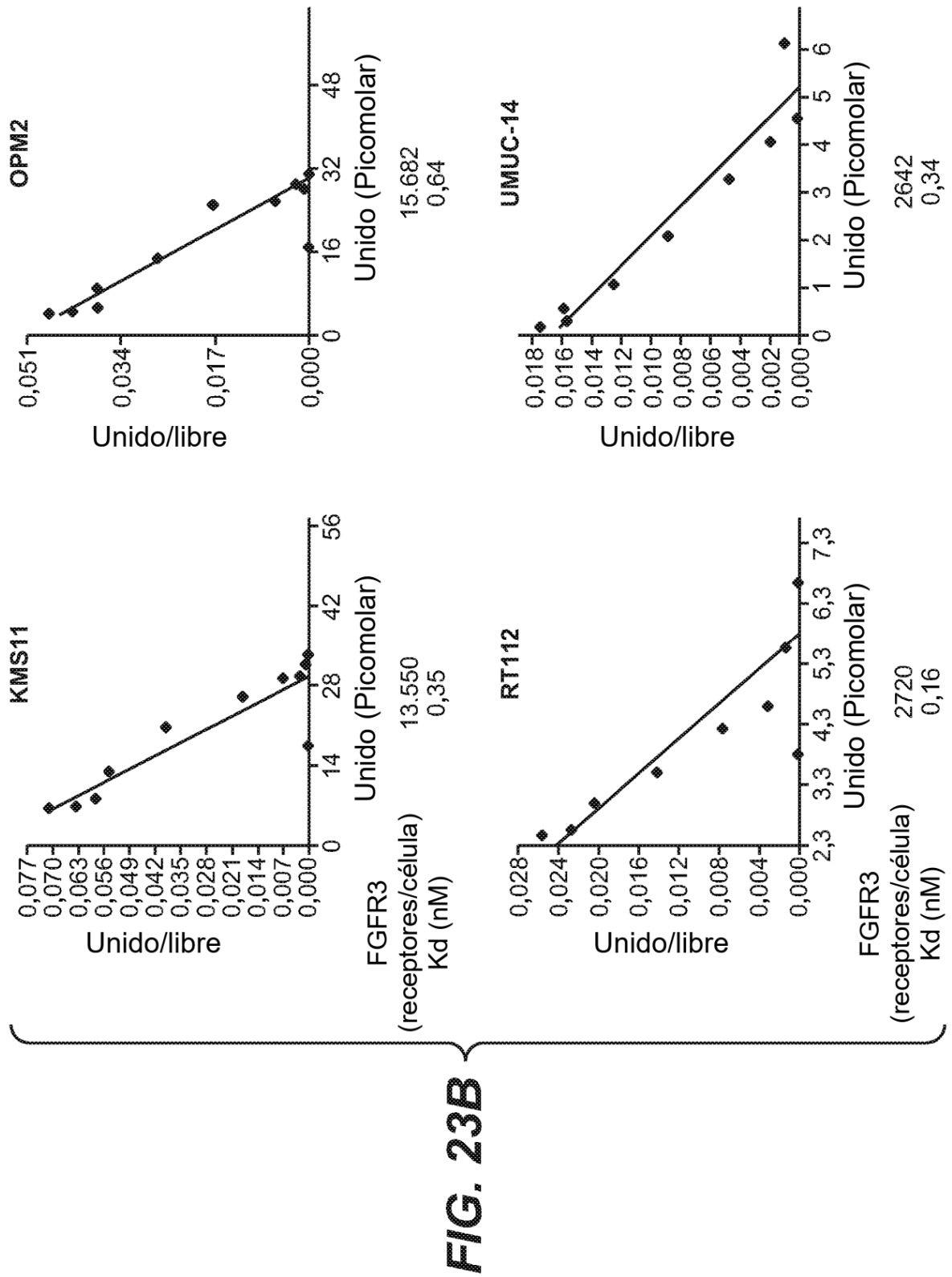


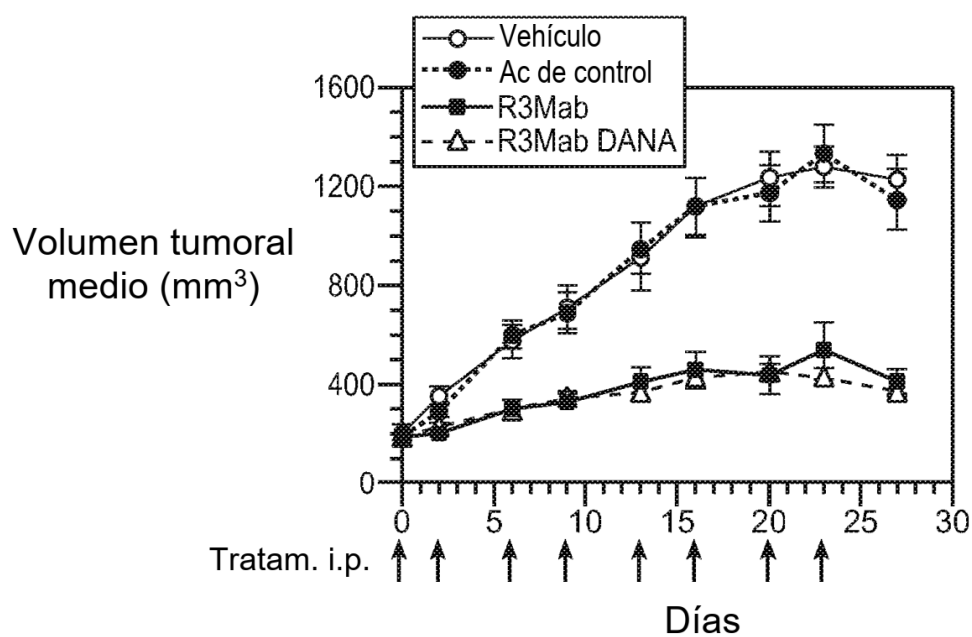
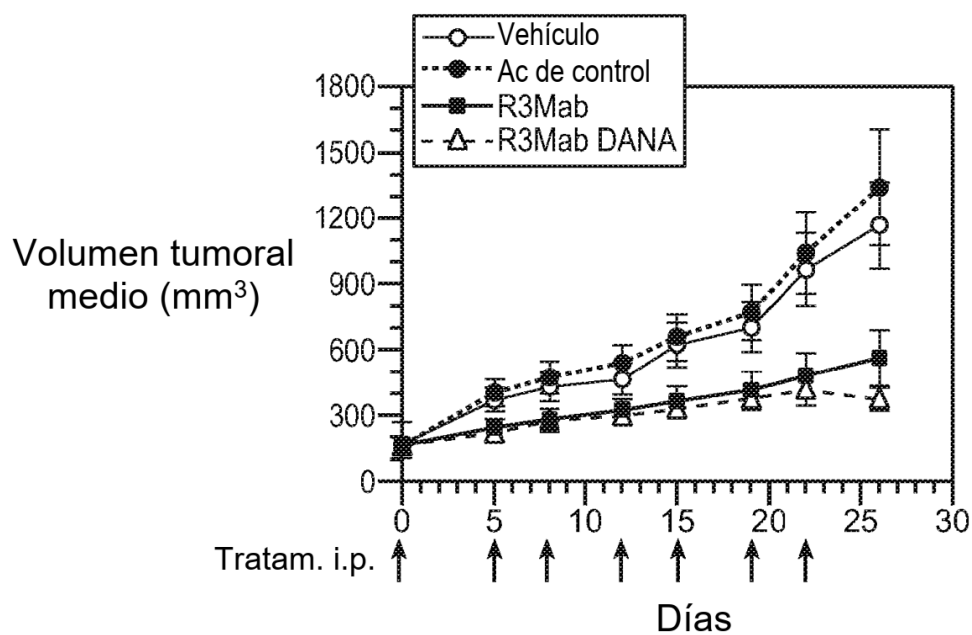
CPM relativas
(veces con respecto
a no tratado)

FIG. 22C



**FIG. 23A**



**FIG. 24A****FIG. 24B**