

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 377**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2018** **PCT/EP2018/058390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018** **WO18185050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2018** **E 18714525 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021** **EP 3606953**

54 Título: **Moléculas de unión a FGFR3**

30 Prioridad:

03.04.2017 EP 17164482

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

07.12.2021

73 Titular/es:

CILAG GMBH INTERNATIONAL (100.0%)
Gubelstrasse 34
6300 Zug, CH

72 Inventor/es:

SILACCI MELKKO, MICHAELA;
WOODS, RICHARD;
HENNE, PATRICIA;
ZUBLER, BARBARA;
KAGE, ELENA;
GRABULOVSKI, DRAGAN y
BERTSCHINGER, JULIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 883 377 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

Moléculas de unión a FGFR3

5 Antecedentes de la invención

FGFR3 es uno de los cuatro miembros de la familia FGFR de receptores de tirosina cinasa transmembrana que están implicados en las vías de señalización intracelular. Se ha demostrado que la activación de FGFR a través de la interacción con factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tiene un papel fundamental tanto en la embriogénesis como en adultos con una gama pleótrópica de secuelas, incluyendo la proliferación y la supervivencia celulares, la migración, la diferenciación y la detención del crecimiento [1].

Los FGFR consisten en una región de unión a ligando extracelular, con dos o tres dominios de tipo inmunoglobulina (IgD1-3), una región transmembrana de un solo paso y un dominio tirosina cinasa dividido citoplasmático.

En seres humanos, la señalización está mediada por 1 de 22 ligandos de FGF y la especificidad del receptor para el ligando está controlada por la expresión celular diferencial de los receptores, la secreción de proteínas de superficie celular que modulan la interacción y el corte y empalme alternativo de los receptores [1]. FGFR1, 2 y 3 tienen cada uno dos isoformas principales cortadas y empalmadas de forma alternativa, 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. Los ligandos de FGF provocan la dimerización de los FGFR, lo que conduce a la activación y la fosforilación del dominio tirosina cinasa intracelular. Esto conduce a la activación de varias vías clave implicadas en la señalización oncogénica, incluyendo la vía de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía de PI3K-AKT.

Se han implicado FGFR activados anómalamente en neoplasias malignas humanas específicas [2]. 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 la sobreexpresión de FGFR3 y se correlaciona con una supervivencia general más corta [2]. El FGFR3 también está implicado en conferir quimiorresistencia a estirpes celulares de mieloma en cultivo [3], lo que es coherente con la escasa respuesta clínica de los pacientes t(4;14) a la quimioterapia convencional [4]. La sobreexpresión de FGFR3 activado por mutación es suficiente para inducir la transformación oncogénica en células hematopoyéticas y fibroblastos [5-8], modelos en ratones transgénicos [9] y modelos de trasplante de médula ósea murina [9, 10].

En consecuencia, el FGFR3 se ha propuesto como una posibles diana terapéutica en el mieloma múltiple. De hecho, varios inhibidores de molécula pequeña dirigidos a los FGFR, aunque no son selectivos para FGFR3 y tienen actividad inhibidora cruzada hacia determinadas otras cinasas, han demostrado citotoxicidad contra células de mieloma positivas para FGFR3 en cultivo y en modelos en ratón [11-15].

También se ha documentado la sobreexpresión de FGFR3 en una alta fracción de cánceres de vejiga [16, 17]. Además, se han identificado mutaciones activadoras somáticas en FGFR3 en el 60-70 % de los carcinomas de vejiga papilares y el 16-20 % de los carcinomas de vejiga invasores de músculo [17, 18]. En experimentos de cultivo celular, ARN de interferencia [19] o un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario de FGFR3 inhibieron la proliferación celular de células de cáncer de vejiga [20]. Un estudio reciente demostró que un conjugado de anticuerpo de FGFR3-toxina atenúa el crecimiento de xenoinjerto de una estirpe celular de cáncer de vejiga a través de la entrega de toxina mediada por FGFR3 en tumores [21]. Las publicaciones relacionadas con FGFR3 y anticuerpos anti-FGFR3 incluyen el documento US 2005/0147612; el documento WO 2010/111367; Rauchenberger et al., *J Biol Chem* 278 (40): 38194-38205 (2003) [22]; el documento WO 2006/048877; Martinez-Torrecuadrada et al., (2008) *Mol Cancer Ther* 7 (4): 862-873; el documento WO 2007/144893; Trudel et al. (2006) 107 (10): 4039-4046; Martinez-Torrecuadrada et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11 (17): 6280-6290; Gomez-Roman et al. (2005) *Clin Cancer Res* 11: 459-465; y el documento WO 2010/002862.

Estos anticuerpos tienen una o más de las siguientes desventajas: tienen la capacidad de reconocer solamente una de las isoformas o muestran una diferencia significativa entre las afinidades por las diferentes isoformas.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de moléculas que puedan unirse a ambas variantes de corte y empalme FGFR3b y FGFR3c, con alta afinidad y especificidad, y que al mismo tiempo sean capaces de internalizarse bien en una célula.

Esta necesidad se aborda mediante la presente invención.

Descripción de la invención

A partir de varios cribados diferentes, se identificó un conjunto de polipéptidos Fynómero con una sorprendente combinación de propiedades, incluyendo una alta afinidad por FGFR3b y FGFR3c y la capacidad de una buena internalización en las células, conjunto de polipéptidos que superó en rendimiento a un gran número de otros

candidatos para una combinación de estas propiedades. Las secuencias de estos polipéptidos se desvelan en el presente documento. Además de los propios polipéptidos, la invención también proporciona construcciones de fusión que comprenden dichos polipéptidos, incluyendo fusiones de los mismos a anticuerpos. La invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos o construcciones de fusión de la invención.

5 Adicionalmente, se proporcionan composiciones farmacéuticas o de diagnóstico que comprenden polipéptidos o construcciones de fusión de la invención, así como dichas composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento del cáncer o enfermedades mediadas por linfocitos T.

10 La presente invención se refiere en un primer aspecto a un polipéptido que se une a las isoformas 3b y 3c del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3b y FGFR3c), en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) GVTLFVALYDYEVYGPMPMSFHKGEKFQIL(X¹)(X²)(X³)(X⁴)GPYWEARSL(X⁵)TGETG(X⁶)IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), en la que las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶) pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos; (b) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos de (a), en la que
15 la determinación de identidad excluye las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶) y a condición de que la secuencia de aminoácidos EVYGPMPM (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 esté conservada y los aminoácidos P e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1 estén conservados; (c) GVTLFVALYDYEVMTTALS FHKGEKFQILSQSPHGQYWEARSLTTGETG(X⁶)IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 19), en la que la posición del aminoácido (X⁶) puede ser cualquier aminoácido; y (d) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos de (c), en la que la determinación de identidad excluye la posición del aminoácido (X⁶) y a condición de que las secuencias de aminoácidos EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) en las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 y SQSPH (SEQ ID NO: 21) en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 estén conservadas y los aminoácidos Q e Y en las posiciones
20 de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19 estén conservados.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo proteínas monocatenarias o sus fragmentos, que contienen más de aproximadamente 60 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar adicionalmente multímeros, por ejemplo, oligómeros, que consisten en
30 al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Además, los peptidomiméticos de dichos polipéptidos donde los uno o más aminoácidos y/o los uno o más enlaces peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales también se incluyen en la invención. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como la selenocisteína.
35 El término "polipéptido" también se refiere a polipéptidos modificados naturalmente en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son bien conocidas en la técnica.

El polipéptido de la presente invención es un polipéptido derivado de SH de Fyn 3 o Fynómero. Los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn o Fynómeros son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, págs. 3196-3204; documento WO 2008/022759; Bertschinger et al. (2007) *Protein Eng Des Sel* 20 (2): 57-68; y Gebauer y Skerra (2009) *Curr Opinion in Chemical Biology* 13: 245-255. La expresión "polipéptido derivado de SH3 de Fyn", utilizado indistintamente en el presente documento con el término "Fynómero", se refiere a un polipéptido de unión no derivado de inmunoglobulina (por ejemplo, un armazón como se describe en Gebauer y Skerra (2009) *Curr Opinion in Chemical Biology* 13: 245-255) derivado del dominio Fyn SH3 humano. Los Fynómeros son polipéptidos globulares pequeños de aproximadamente 7 kDa. El dominio SH3 de la cinasa Fyn humana se usó satisfactoriamente como un armazón para diseñar por ingeniería genética proteínas (proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn denominadas Fynómeros) que se unen con alta afinidad y especificidad a diferentes proteínas diana (documento WO 2008/022759, documento WO 2011/023685, documento WO 2013/135588, documento WO 2014/170063, Grabulovski D. et al., (2007) *J Biol Chem* 282, págs. 3196-3204, Bertschinger J. et al. (2007) *Protein Eng Des Sel*, 20, págs. 57-68, y Schlatter et al. (2012) *mAbs*, 4 (4) págs. 497-50).

La frase "unión a las isoformas 3b y 3c del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos" (FGFR3b y FGFR3c o FGFR3b y 3c) como se usa requiere que los polipéptidos de la invención formen interacciones de unión (*in vivo* y/o *in vitro*) con FGFR3b y FGFR3c. Las isoformas 3b (FGFR3b) y 3c (FGFR3c) se forman mediante corte y empalme alternativo. Las variantes de corte y empalme se generan mediante el uso de dos exones alternativos, 3b y 3c, que codifican la mitad C-terminal del dominio de Ig 3. Las células epiteliales muestran exclusivamente los transcritos 3b, mientras que las células fibroblásticas muestran una mezcla de los transcritos 3b y 3c. La secuencia de aminoácidos del FGFR3b humano se muestra en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos del FGFR3c humano se muestra
55 en la SEQ ID NO: 10. Los polipéptidos de la invención se unen preferentemente a las isoformas 3b y 3c del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos. Preferentemente, los polipéptidos de la invención se unen a ambas isoformas, FGFR3b y FGFR3c con una K_D de 10⁻⁷ a 10⁻¹² M, más preferentemente de 10⁻⁸ a 10⁻¹² M, mucho más preferentemente de 10⁻⁹ a 10⁻¹² M. A este respecto, se prefiere que los polipéptidos de la invención se unan específicamente a FGFR3, preferentemente específicamente a ambas isoformas FGFR3b y FGFR3c y, por tanto, no se unan significativamente a otras proteínas relacionadas tales como FGFR1, FGFR2 o FGFR4. A este respecto, unión
60 65

significativa designa preferentemente la unión con una K_D de $> 5 \times 10^{-6}$ M.

La SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 19 como se han mostrado anteriormente en el presente documento derivan de la secuencia de aminoácidos del dominio SH3 de la cinasa Fyn humana (SEQ ID NO: 11; aa 83-145 de cinasa Fyn según lo publicado por Kawakami et al. y Semba et al. en 1986). La SEQ ID NO: 11 es: GVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 11). En la SEQ ID NO: 11, como se ha mostrado anteriormente, las secuencias del bucle RT y el src están subrayadas y doblemente subrayadas, respectivamente. Grabulovski et al. (2007) *JBC*, 282, págs. 3196-3204 investigó la influencia de mutaciones en los bucles RT y src de los dominios SH3 de Fyn y demostró que las mutaciones en estos bucles adyacentes a la superficie hidrófoba podrían determinar la capacidad de este dominio para participar en asociaciones intermoleculares. Por otra parte, el documento EP 2054432 muestra que las mutaciones en y adyacentes al bucle RT y/o al src determinan la especificidad de unión de un dominio SH3. La secuencia de aminoácidos del dominio SH3 de Fyn está completamente conservada entre el ser humano, el ratón, la rata y el mono (gibón). El SH3 de Fyn de pollo difiere en una posición de aminoácido, el de *Xenopus laevis* en dos posiciones de aminoácidos del dominio humano correspondiente. Al igual que otros dominios SH3, el dominio SH3 de Fyn está compuesto por dos láminas β antiparalelas y contiene dos bucles flexibles (denominados bucles RT y src) con el fin de interactuar con otras proteínas.

Con más detalle, la SEQ ID NO: 1 es una secuencia resultado de una alineación de las SEQ ID NO 3 a 8 (véase la Fig. 1). Como es evidente a partir de la Fig. 1, las posiciones (X^1) a (X^4) de la SEQ ID NO: 1 corresponden al bucle src del dominio SH3 de la cinasa Fyn de la SEQ ID NO: 11. Entre las SEQ ID NO 3 a 8, los aminoácidos dentro del bucle src difieren entre sí. Por otro lado, la segunda y tercera posición C terminal con respecto al bucle src son "DW" en la secuencia de tipo silvestre, mientras que los aminoácidos correspondientes en todas las SEQ ID NO 3 a 8 son "PY". Como también es evidente a partir de la Fig. 1, las posiciones correspondientes al bucle RT del dominio SH3 de la cinasa Fyn de la SEQ ID NO: 11 (es decir, la secuencia subrayada y la D adyacente), se cambian en comparación con la secuencia de SH3 de Fyn de tipo silvestre pero se conservan entre las SEQ ID NO: 3 a 8 y tienen la secuencia "EVYGP TPM" (SEQ ID NO: 2). Las posiciones de aminoácidos dentro de los bucles RT y src, incluyendo los aminoácidos que están adyacentes a estos bucles, determinan la especificidad de unión a FGFR3b y 3c.

De acuerdo con la SEQ ID NO: 1, no solo las posiciones de aminoácidos (X^1) a (X^4) pueden ser cualquier aminoácido sino también las posiciones de aminoácidos (X^5) y (X^6). Como puede extraerse de la Fig. 1, los aminoácidos en las posiciones (X^5) y (X^6) pueden diferir entre las SEQ ID NO 3 a 8 o con respecto al dominio SH3 de Fyn de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 11. Se cree que las diferencias de aminoácidos en estas posiciones no son esenciales para la especificidad de unión de las SEQ ID NO 3 a 8. Por tanto, las posiciones de aminoácidos (X^5) y (X^6) pueden intercambiarse o suprimirse, o pueden añadirse más aminoácidos, sin interferir sustancialmente con la especificidad de unión a FGFR3b y 3c. Si se intercambian aminoácidos en comparación con los aminoácidos que pueden encontrarse en las SEQ ID NO 1 a 8 en las posiciones de aminoácidos (X^5) a (X^6), se prefieren los intercambios conservadores.

La SEQ ID NO: 19 es una secuencia resultado del polipéptido anti-FGFR3b y FGFR3c de la SEQ ID NO: 22. Las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 22 (EVMSTTA (SEQ ID NO: 20)) corresponden al bucle RT del dominio SH3 de la cinasa Fyn de la SEQ ID NO: 11, y las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 22 (SQSPH (SEQ ID NO: 21)) corresponden al bucle src del dominio SH3 de la cinasa Fyn de la SEQ ID NO: 11. La segunda y tercera posición C-terminal con respecto al bucle src son "DW" en la secuencia de tipo silvestre mientras que los aminoácidos correspondientes en la SEQ ID NO: 22 son "QY". También en la SEQ ID NO: 22, las posiciones de aminoácidos dentro de los bucles RT y src, incluyendo los aminoácidos que están adyacentes a estos bucles, determinan la especificidad de unión a FGFR3b y 3c.

De acuerdo con la SEQ ID NO: 19, la posición de aminoácido (X^6) puede ser cualquier aminoácido. La posición de aminoácido (X^6) de la SEQ ID NO: 19 corresponde a la posición de aminoácido (X^6) de la SEQ ID NO: 1. En las SEQ ID NO 1 y 19 el aminoácido (X^6) difiere del dominio SH3 de Fyn de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 11. El aminoácido correspondiente es Y en la SEQ ID NO: 11, W en la SEQ ID NO: 19 y L en las SEQ ID NO 3 a 8.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "identidad de secuencia en porcentaje (%)" describe el número de coincidencias ("hits") de nucleótidos/aminoácidos idénticos de dos o más secuencias de aminoácidos o ácido nucleico alineadas en comparación con el número de nucleótidos o restos de aminoácidos que constituyen la longitud total de las secuencias molde de aminoácidos o ácido nucleico. En otros términos, usando una alineación, para dos o más secuencias o subsecuencias, puede determinarse el porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, una identidad del 95 %, 97 % o 98 %), cuando las (sub)secuencias se comparan y alinean para determinar una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o en una región designada medida usando un algoritmo de comparación de secuencia conocido en la técnica, o cuando se alinean manualmente y se inspeccionan visualmente. Por tanto, las secuencias que se comparan para determinar la identidad de secuencia pueden diferir en la una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos o aminoácidos. Esta definición también se aplica al complemento de una secuencia de ensayo.

El experto también conoce programas adecuados para alinear secuencias polipeptídicas. El porcentaje de identidad de secuencia de las secuencias polipeptídicas puede, por ejemplo, determinarse con programas como los programas explicados anteriormente CLUSTLAW, FASTA y BLAST. Preferentemente se usa el programa BLAST, en concreto, el algoritmo NCBI BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "*Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402).

Con respecto a la identidad de secuencia citada en el punto (b) anteriormente en el presente documento, se prefiere que la identidad de secuencia sea de al menos el 98 %. A este respecto, cabe destacar adicionalmente que la identidad de secuencia de al menos el 95 % mencionada en el punto (b) permite dos cambios de aminoácidos, mientras que la identidad preferida de al menos el 98 % permite solo un cambio de aminoácidos. Por tanto, el punto (b) citado anteriormente en el presente documento también se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere en dos cambios de aminoácidos y preferentemente en un cambio de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del punto (a) mencionado anteriormente en el presente documento, en el que el uno o más cambios de aminoácidos pueden encontrarse en las posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 distintas de (X¹) a (X⁶), la secuencia de aminoácidos EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 y los aminoácidos P e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1. Se cree que los aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 distintos de (X¹) a (X⁶), la secuencia de aminoácidos EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 y los aminoácidos P e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1 no son esenciales para la especificidad de unión de las SEQ ID NO 3 a 8. Por tanto, estas posiciones de aminoácidos pueden intercambiarse o suprimirse, o puede añadirse un aminoácido, sin interferir sustancialmente con la especificidad de unión a FGFR3b y 3c. Estas posiciones de aminoácidos preferentemente se intercambian. Si se intercambian aminoácidos, se prefieren los intercambios conservadores.

Con respecto a la identidad de secuencia citada en el punto (d) anteriormente en el presente documento, se prefiere que la identidad de secuencia sea de al menos el 97 %. A este respecto, cabe destacar adicionalmente que la identidad de secuencia de al menos el 95 % citada en el punto (d) permite dos cambios de aminoácidos, mientras que la identidad preferida de al menos el 97 % permite solo un cambio de aminoácidos. Por tanto, el punto (d) citado anteriormente en el presente documento también se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere en dos cambios de aminoácidos y preferentemente en un cambio de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del punto (c) citado anteriormente en el presente documento, en el que el uno o más cambios de aminoácidos pueden encontrarse en las posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 distintos de las secuencias de aminoácidos EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) en las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 y SQSPH (SEQ ID NO: 21) en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 y los aminoácidos Q e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19. Se cree que los aminoácidos en la SEQ ID NO: 19 distinta de las secuencias de aminoácidos EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) en las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 y SQSPH (SEQ ID NO: 21) en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 y los aminoácidos Q e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19 no son esenciales para la especificidad de unión de la SEQ ID NO: 22. Por tanto, estas posiciones de aminoácidos pueden intercambiarse o suprimirse, o puede añadirse un aminoácido, sin interferir sustancialmente con la especificidad de unión a FGFR3b y 3c. Estas posiciones de aminoácidos preferentemente se intercambian. Si se intercambian aminoácidos, se prefieren los intercambios conservadores.

La frase "la determinación de identidad excluye las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶)" como se usa en el presente documento en relación con la SEQ ID NO: 1 especifica que el cálculo de la secuencia de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 1 no tiene en cuenta las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶). Análogamente, la frase "la determinación de identidad excluye la posición de aminoácido (X⁶)" como se usa en el presente documento en relación con la SEQ ID NO: 19 especifica que el cálculo de la secuencia de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 19 no tiene en cuenta la posición de aminoácido (X⁶).

La condición "a condición de que la secuencia de aminoácidos EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 esté conservada", como se usa en el presente documento, especifica que no pueden introducirse cambios de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1. Análogamente, la condición "a condición de que los aminoácidos P e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1 estén conservados", como se usa en el presente documento, especifica que no pueden introducirse cambios de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1. En otros términos, las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 tienen la secuencia EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) y los aminoácidos en las posiciones 37 y 38 son P e Y, respectivamente, en todos los polipéptidos que pertenecen al ámbito de los puntos (a) y (b) de la primera realización de la invención y los ejemplos preferidos de la misma.

La condición "a condición de que las secuencias de aminoácidos EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) en las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 y SQSPH (SEQ ID NO: 21) en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 estén conservadas", como se usa en el presente documento, especifica que no pueden introducirse cambios de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 12 a 18, así como 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19.

Análogamente, la condición "a condición de que los aminoácidos Q e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19 estén conservados", como se usa en el presente documento, especifica que no pueden introducirse cambios de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19. En otros términos, las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 tienen la secuencia EVMSTTA (SEQ ID NO: 20), las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 tienen la secuencia SQSPH (SEQ ID NO: 21) y los aminoácidos en las posiciones 37 y 38 son Q e Y, respectivamente, en todos los polipéptidos que pertenecen al ámbito de los puntos (c) y (d) de la primera realización de la invención y los ejemplos preferidos de la misma.

Como se ha mencionado, cualquier sustitución de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 19 es preferentemente una sustitución conservadora de aminoácidos. Una sustitución conservadora específica el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene una propiedad química similar al aminoácido que se reemplaza. Preferentemente, la sustitución conservadora a la que se hace referencia en el presente documento es una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en: (i) una sustitución de un aminoácido básico con un aminoácido básico diferente; (ii) una sustitución de un aminoácido ácido con un aminoácido ácido diferente; (iii) una sustitución de un aminoácido aromático con un aminoácido aromático diferente; (iv) una sustitución de un aminoácido alifático no polar con un aminoácido alifático no polar diferente; y (v) una sustitución de un aminoácido polar sin carga con un aminoácido polar sin carga diferente. Los aminoácidos básicos son arginina, histidina y lisina. Los aminoácidos ácidos son aspartato y glutamato. Los aminoácidos aromáticos son fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos alifáticos no polares son glicina, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina y prolina. Los aminoácidos polares sin carga son serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. A diferencia de una sustitución conservadora de aminoácidos, una sustitución no conservadora de aminoácidos es el intercambio de un aminoácido con cualquier aminoácido que no pertenezca a las sustituciones conservadoras descritas anteriormente (i) a (v).

Los Fynómeros anti-FGFR3 desvelados en el presente documento tienen ventajosamente una excelente afinidad de unión a FGFR3c y 3b y además son particularmente adecuados para que se internalicen en las células, donde pueden ejercer un efecto diagnóstico o terapéutico. Como puede extraerse de los ejemplos a continuación en el presente documento, se descubrió el Fynómero anti-FGFR3 de la SEQ ID NO 3 cuando se cribó una gran biblioteca de Fynómeros. Se ha demostrado que los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 y 19 tienen propiedades sobresalientes en términos de su afinidad de unión a las isoformas de FGFR3 3b y 3c, así como de sus propiedades de internalización celular; véanse los Ejemplos 1 y 7. Por tanto, el Fynómero con la SEQ ID NO: 19 es una alternativa a los Fynómeros de la SEQ ID NO: 1. Inesperada y ventajosamente, ambos Fynómeros tienen una combinación similar de propiedades ventajosas. El Fynómero anti-FGFR3 de la SEQ ID NO: 3 se usó como molde para la maduración de afinidad e incluso fue posible mejorar adicionalmente la afinidad de unión a FGFR3b y 3c. Con más detalle, entre un gran conjunto de polipéptidos resultado del proceso de maduración de afinidad, se descubrió que el Fynómero anti-FGFR3 de la SEQ ID NO: 4 a 8 se unía aún más fuertemente a FGFR3b y 3c que el Fynómero anti-FGFR3 de la SEQ ID NO: 3. Los ejemplos a continuación en el presente documento muestran además que los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 a 8 y 22 pueden producirse de forma recombinante y tienen propiedades de fabricación favorables y, por tanto, pueden producirse a gran escala, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Además, los Fynómeros anti-FGFR3 de la SEQ ID NO: 3 a 8 y 22 no solo se unen a FGFR3c y 3b humanos sino también a FGFR3c (y probablemente también 3b) de ratón y mono. Esta unión entre especies es ventajosa para ensayos preclínicos. Estas moléculas podrían usarse con fines de diagnóstico y también son adecuadas como punto de partida para el desarrollo de agentes terapéuticos adicionales contra células tumorales que expresan FGFR3 en su superficie, por ejemplo, como se describe con más detalle en el presente documento. Ninguno de los otros Fynómeros anti-FGFR3 identificados mediante los cribados iniciales o en el proceso de maduración de afinidad posterior tuvo una combinación ventajosa de propiedades como la de los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 a 8 y 22. La combinación ventajosa sorprendente e impredecible de propiedades de los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 a 8 y 22 serán más evidentes a partir de los ejemplos a continuación en el presente documento.

De acuerdo con una realización preferida del primer aspecto de la invención, (X¹) es N, R o K, y es preferentemente R o K; (X²) es S, G, K o R, y es preferentemente G, K o R; (X³) es S o G, y es preferentemente G; y (X⁴) es E, Q, D, S o K, y es preferentemente Q, D, S o K.

De acuerdo con otra realización preferida del primer aspecto de la invención, (X¹) es N, R o K, y es preferentemente R o K; (X²) es S, G, K o R, y es preferentemente G, K o R; (X³) es S o G, y es preferentemente G; (X⁴) es E, Q, D, S o K, y es preferentemente Q, D, S o K; (X⁵) es T o A; y (X⁶) es Y, W o L, y es preferentemente L o W.

Las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁴) en la SEQ ID NO: 1 son las posiciones de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos que forman el bucle src del dominio SH3 de Fyn de tipo silvestre humano. Los ejemplos a continuación muestran que los aminoácidos enumerados para las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁴) confieren especificidad de unión a FGFR3b y FGFR3c, en particular FGFR3b que tiene la SEQ ID NO: 9 y FGFR3c que tiene la SEQ ID NO: 10. Con más detalle, la alineación de secuencia de las SEQ ID NO 3 a 8 de la invención en la Fig. 1 muestra que en los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 a 8 pueden encontrarse los aminoácidos que se enumeran para las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁴) en la realización preferida anterior. Los aminoácidos preferidos que se enumeran para las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁴) en la realización preferida anterior pueden encontrarse en las

posiciones de aminoácidos correspondientes de las SEQ ID NO 4 a 8, destacándose que las SEQ ID NO 4 a 8 se obtuvieron a partir de la SEQ ID NO: 3 por maduración de afinidad. Puede esperarse que también otras secuencias de aminoácidos seleccionadas entre (X¹) a (X⁴) como se han definido anteriormente que las combinaciones de aminoácidos específicas para (X¹) a (X⁴) presentes en las SEQ ID NO 3 a 8, preferentemente en las SEQ ID NO 4 a 8, confieran especificidad de unión a FGFR3b y 3c.

Como se ha analizado anteriormente, la posición de aminoácido (X⁵) en la SEQ ID NO: 1 y la posición de aminoácido (X⁶) en las SEQ ID NO 1 y 19 son posiciones de aminoácidos que no corresponden a los aminoácidos de los bucles RT y src del dominio SH3 de Fyn de tipo silvestre humano ni los aminoácidos que están adyacentes a uno de estos bucles. Por tanto, se cree que los aminoácidos en estas posiciones pueden intercambiarse o suprimirse, o puede añadirse un aminoácido adicional, sin interferir sustancialmente con la especificidad de unión a FGFR3b y 3c. Los aminoácidos en las posiciones (X⁵) y (X⁶) preferentemente se intercambian. Se prefiere más que (X⁵) sea T o A; y (X⁶) sea Y, W o L, y mucho más preferentemente sea L o W. Como puede extraerse de la Fig. 1, estos aminoácidos para (X⁵) de la SEQ ID NO: 1 y (X⁶) de las SEQ ID NO 1 y 19 pueden encontrarse en las SEQ ID NO 3 a 8 y 22 o el dominio de SH3 de Fyn de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 11) o en otro Fynómero de unión a FGFR3b y 3c. En el caso del aminoácido más preferido para la posición (X⁶), este aminoácido puede encontrarse en las SEQ ID NO 3 a 8.

De acuerdo con una realización más preferida del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO 3 a 8 y 22, preferentemente entre una cualquiera de las SEQ ID NO 4 a 8 o 22.

Como puede extraerse de los ejemplos a continuación en el presente documento, las SEQ ID NO 3 a 8 y 22 son las secuencias de los Fynómeros anti-FGFR3b y 3c concretos que se generaron y se sometieron a ensayo.

De acuerdo con una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 22. Se prefiere en particular un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Otra realización particularmente preferida es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Fue bastante sorprendente obtener un Fynómero con baja afinidad nanomolar incluso en un primer cribado. Se aisló un Fynómero que tenía la SEQ ID NO 3 de una biblioteca de Fynómeros como el Fynómero que tenía las propiedades de afinidad e internalización de unión a FGFR3b y 3c más sobresalientes. Los Fynómeros con las SEQ ID NO 4 a 8 derivaron de la SEQ ID NO: 3 y la afinidad de unión a FGFR3b y 3c de Fynómeros que tenían las SEQ ID NO 4 a 8 mejora aún más.

Sorprendentemente, un Fynómero con la SEQ ID NO: 22 también tenía muy buenas propiedades, comparables a las de las SEQ ID NO 4 a 8, aunque inicialmente derivó de una familia diferente de Fynómeros.

La presente invención se refiere en un segundo aspecto a una construcción de fusión que comprende el polipéptido de la invención fusionado a un compuesto adicional.

Una "construcción de fusión" que se ha utilizado en el presente documento define la fusión del polipéptido de la invención a un compuesto adicional. El compuesto puede ser un compuesto proteínico o un compuesto no proteínico. En el caso de que el compuesto sea un compuesto proteínico (por ejemplo, una citocina o quimiocina, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, como se describe a continuación en el presente documento), la construcción de fusión también puede designarse como proteína de fusión. La expresión "proteína de fusión", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una construcción polipeptídica generada a través de la unión y expresión de dos o más genes que codifican polipéptidos separados o un polipéptido y un péptido. En otras palabras, la traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos originales. Los polipéptidos pueden fusionarse directamente o a través de un enlazador, es decir, una secuencia peptídica corta. En general, las proteínas de fusión se generan artificialmente por tecnología de ADN recombinante bien conocida por el experto (por ejemplo, Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4^a ed. Garland Science, págs. 518-519). Sin embargo, los polipéptidos y las proteínas de fusión de la invención pueden prepararse mediante cualquiera de las muchas técnicas convencionales y bien conocidas, tales como estrategias de síntesis orgánicas simples, técnicas de síntesis asistida en fase sólida o mediante sintetizadores automatizados disponibles en el mercado. Las proteínas de fusión pueden usarse en investigación biológica, diagnóstico o terapéutica.

Son ejemplos de compuestos no proteínicos como compuesto adicional, por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, tales como polietilenglicol (PEG) o Alexa Fluor, o radionúclidos. Se analizan a continuación en el presente documento ejemplos específicos adicionales de compuestos adicionales no proteínicos.

De acuerdo con determinadas realizaciones del segundo aspecto de la invención, el compuesto adicional es un compuesto farmacéuticamente activo, un profármaco, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto

diagnóticamente activo, un potenciador de penetración celular y/o un compuesto modulador de la semivida sérica.

Un compuesto farmacéuticamente activo es un compuesto que tiene una actividad biológica tras la administración a un sujeto, lo que produce un efecto beneficioso para el sujeto. Un profármaco es un compuesto que se administra en forma inactiva (o menos que completamente activa) a un sujeto y posteriormente se convierte en un compuesto farmacéuticamente activo o farmacéuticamente completamente activo a través de procesos metabólicos en el sujeto. El compuesto farmacéuticamente (completamente) activo es preferentemente un compuesto adecuado para el tratamiento de prevención de cualquiera de las enfermedades específicas que se definen a continuación en el presente documento.

Un compuesto diagnóticamente activo es un compuesto que tiene una actividad tras la administración a un sujeto, lo que permite (ayudar en) la determinación o identificación de una enfermedad o trastorno, si un individuo está afectado con ella. Los ejemplos de compuestos diagnóticamente activos incluyen marcadores detectables tales como colorantes fluorescentes, radionúclidos o agentes de contraste para la formación de imágenes médicas. A continuación en el presente documento se describen ejemplos específicos de colorantes fluorescentes, radionúclidos y agentes de contraste para la formación de imágenes médicas. Un compuesto diagnóticamente activo fusionado a un polipéptido de la invención puede usarse en particular para ayudar en la determinación o identificación, o para determinar o identificar una cualquiera de las enfermedades específicas definidas a continuación en el presente documento que tienen en común que su origen y/o uno o más síntomas están relacionados con FGFR3, en particular relacionados con FGFR3b y 3c. Los sitios de dicha enfermedad dentro del cuerpo de un sujeto pueden detectarse o identificarse mediante el polipéptido de la invención fusionado al compuesto diagnóticamente activo de la invención.

Un potenciador de la penetración celular es un compuesto que facilita la entrega del polipéptido de la invención a una célula (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*).

Un compuesto modulador de la semivida sérica es un compuesto que permite prolongar la semivida *in vivo* de los polipéptidos de la invención, en particular en el sistema circulatorio sanguíneo. El componente modulador de la semivida sérica es preferentemente polietilenglicol (PEG).

Un vehículo farmacéuticamente aceptable es un compuesto que facilita o mejora, por ejemplo, la entrega y/o la eficacia del polipéptido de la invención tras la administración a un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, estabilizadores, antioxidantes, sustancias reguladoras del pH, etc.

De acuerdo con una realización del segundo aspecto de la invención, el compuesto adicional es un compuesto tóxico.

El compuesto tóxico es preferentemente un compuesto orgánico pequeño o un polipéptido, por ejemplo, un compuesto tóxico seleccionado entre el grupo que consiste en caliqueamicina, maitansinoide, neocarzinostatina, esperamicina, dinemicina, kedarcidina, maduroeptina, doxorubicina, daunorrubicina, auristatina, cadena de Ricina-A, modeccina, exotoxina A de *Pseudomonas truncada*, toxina diftérica y gelonina recombinante.

De acuerdo con otra realización del segundo aspecto de la invención, el compuesto adicional de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en (a) un colorante fluorescente, (b) un fotosensibilizador, (c) un radionúclido, (d) un agente de contraste para la formación de imágenes médicas, (e) una citocina, (f) una quimiocina, (g) un factor procoagulante, (h) una enzima para la activación de profármacos, (i) una proteína de unión de albúmina, (j) una albúmina, (k) una proteína de unión de IgG o (l) polietilenglicol.

Son ejemplos de un colorante fluorescente los colorantes Alexa Fluor y Cy.

Son ejemplos de un fotosensibilizador la proteína fototóxica fluorescente roja KillerRed y la hematoporfirina.

Son ejemplos de un radionúclido isótopos emisores gamma, por ejemplo, ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , emisores de positrones, por ejemplo, ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , emisores beta, por ejemplo, ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , y emisores alfa, por ejemplo, ^{213}Bi , ^{211}At .

Un agente de contraste como se usa en el presente documento es una sustancia utilizada para potenciar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo en la formación de imágenes médicas. Los agentes de contraste comunes funcionan en basándose en la atenuación de rayos X y la potenciación de la señal de resonancia magnética.

Por ejemplo, puede seleccionarse una citocina entre el grupo que consiste en IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN alfa, IFN beta, IFN gamma, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF beta, LT-beta, ligando de CD-40, ligando de Fas, TGF-beta, IL-1 alfa e IL-1 beta. Como es bien sabido en la técnica, las citocinas pueden favorecer una respuesta proinflamatoria o antiinflamatoria del sistema inmunitario. Por tanto, dependiendo de la enfermedad que se trata, pueden favorecerse las construcciones de fusión con una citocina proinflamatoria o antiinflamatoria. Por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en general se prefieren

construcciones de fusión que comprendan citocinas antiinflamatorias, mientras que para el tratamiento del cáncer en general se prefieren construcciones de fusión que comprendan citocinas proinflamatorias.

Por ejemplo, puede seleccionarse una quimiocina entre el grupo que consiste en IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1 alfa/beta, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MCP-1-5, eotaxina, Eotaxina-2, I-309, MIPF-1, 6Ccina, CTACK, MEC, linfotactina y fractalcina.

Son ejemplos de un factor procoagulante el factor tisular (TF) y el procoagulante canceroso (CP).

Son ejemplos de una enzima para la activación de profármacos enzimas tales como carboxipeptidasas, glucuronidasas o glucosidasas.

Se describen ejemplos de una proteína de unión de albúmina y una proteína de unión de IgG en Gebauer y Skerra (2009), *Curr Opin Chem Biol.*, 13 (3): 245-255. En consecuencia, son ejemplos de proteínas de unión de albúmina y proteínas de unión de IgG los dominios de Ig individuales humanos (Dab de albúmina duplicada), nanocuerpos, dominio de unión a albúmina de origen natural (ABD) derivado de la proteína estreptocócica G y un dominio que se une a IgG. Dichas construcciones de fusión, por ejemplo, aumentan la semivida del polipéptido de la invención tras la administración a un paciente, en particular, en el sistema circulatorio sanguíneo.

De acuerdo con otras realizaciones del segundo aspecto de la invención, el compuesto adicional de la invención comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio Fc de un anticuerpo, un anticuerpo o una combinación de los mismos.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios o fragmentos de los mismos, incluyendo también anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unión distinta de las cadenas pesadas y ligeras, tales como Fab, un F(ab₂)', fragmentos Fv o scFv, etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de éstos. Pueden obtenerse, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de presentación en fagos, puede usarse resonancia de plasmón superficial empleada en el sistema BIAcore para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fago que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido de la invención (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622. Una fuente adicional de anticuerpos que ha de utilizarse de acuerdo con la presente invención son los denominados anticuerpos xenógenos. El principio general para la producción de anticuerpos xenógenos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en el documento WO 91/10741, el documento WO 94/02602, el documento WO 96/34096 y el documento WO 96/33735. Pueden modificarse adicionalmente anticuerpos que han de emplearse de acuerdo con la invención o sus una o más cadenas de inmunoglobulina correspondientes usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de una o más delecciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones de aminoácidos, y/o cualquier otra una o más modificaciones conocidas en la técnica, ya sea solas o en combinación. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

El término anticuerpo también se refiere a derivados de dichos anticuerpos que conservan o conservan esencialmente su especificidad de unión. Mientras que las realizaciones particularmente preferidas de dichos derivados se especifican más adelante en el presente documento, otros derivados preferidos de dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, una región variable de ratón o rata y una región constante humana.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humanizado" significa, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo de origen no humano, cuyas secuencias de proteínas se han modificado para aumentar su similitud con las variantes de anticuerpos producidas de forma natural en seres humanos. La creación de un anticuerpo humanizado puede lograrse, por ejemplo, insertando los segmentos codificantes de CDR apropiados (responsables de las propiedades de unión deseadas), tales como CDR 3 y preferentemente las 6 CDR, en un "armazón" de anticuerpo humano. Se describen métodos para la producción de anticuerpos humanizados en, por ejemplo, el documento EP-A1 0 239 400 y el documento WO 90/07861.

La expresión "cadena ligera de anticuerpo" designa la subunidad polipeptídica pequeña de un anticuerpo, mientras que la expresión "cadena pesada de anticuerpo" designa la subunidad polipeptídica grande de un anticuerpo. Un anticuerpo típico está compuesto por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (Ig) y dos cadenas ligeras de Ig. Cada cadena ligera está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina en tándem; un dominio constante (C_L) y un dominio variable (V_L) que es importante para la unión del antígeno. La cadena pesada determina la clase o el isotipo de un anticuerpo. Cada cadena pesada tiene dos regiones, en concreto, una región constante (que es la misma para

todas las inmunoglobulinas de la misma clase pero que difiere entre las clases) y una región variable que difiere entre las diferentes células B, pero es la misma para todas las inmunoglobulinas producidas por la misma célula B o clon de célula B. El dominio variable de cualquier cadena pesada está compuesto por un único dominio de inmunoglobulina.

Un "dominio Fc funcional" de un anticuerpo es un término bien conocido por el experto en la materia y se define basándose en la escisión de anticuerpos por papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de la cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan [alfa], [delta], [épsilon], [gamma] y [mu], respectivamente. El dominio funcional Fc de un anticuerpo está directamente implicado en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basándose en la activación del complemento, la unión a C1q y la unión al receptor de Fc. Los cuatro isotipos de IgG humana se unen a receptores diferentes, tales como el receptor de Fc neonatal, los receptores gamma de Fc activadores, FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa, el receptor inhibidor FcγRIIb y C1q con diferentes afinidades, produciendo actividades muy diferentes. Se sabe que las afinidades para activar e inhibir los receptores de un dominio Fc de un anticuerpo humano pueden diseñarse por ingeniería genética y modificarse (véase Strohl W. (2009) *Curr Opin Biotechnol*, 20, págs. 685-691).

Preferentemente, el dominio Fc es uno o más dominios Fc funcionales humanos que permiten prolongar la semivida in vivo de los polipéptidos de la invención y algunos de los cuales dirigen la respuesta inmunitaria de un mamífero a un sitio de unión a diana específica del componente polipeptídico inventivo de la proteína de fusión, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas, profilácticas y/o de diagnóstico como se describe a continuación en el presente documento. Más preferentemente, un dominio Fc funcional humano de este tipo es de un anticuerpo IgG1. Los polipéptidos de la invención pueden fusionarse al extremo N o C de uno o más dominios Fc funcionales o con los dos extremos N y C de uno o más dominios Fc. En determinadas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención también pueden comprender multímeros, por ejemplo, tetrámeros, trímeros o dímeros de los polipéptidos de la invención fusionados a al menos un lado, por ejemplo, al extremo N de un dominio Fc.

El dominio Fc puede ser uno o más dominios Fc funcionales humanos diseñados por ingeniería genética de una IgG1 con funciones efectoras activadas o silenciadas, por ejemplo, uno o más dominios Fc funcionales humanos diseñados por ingeniería genética de una IgG1 con funciones efectoras silenciadas, por ejemplo, uno o más dominios Fc funcionales humanos diseñados por ingeniería genética de una IgG1 con funciones efectoras silenciadas con una mutación en L234 y L235, numeración según el índice EU de Kabat (véase Johnson G. y Wu T.T. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, págs. 214-218), por ejemplo, con la mutación L234A y L235A.

El polipéptido de la invención puede ubicarse corriente abajo del extremo C de dicho compuesto adicional que comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio Fc de un anticuerpo, un anticuerpo o una combinación de los mismos. Como alternativa, el polipéptido de la invención puede ubicarse corriente abajo del extremo N de dicho compuesto adicional que comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio Fc de un anticuerpo, un anticuerpo o una combinación de los mismos.

En caso de que la construcción de fusión de la invención comprenda el polipéptido de la invención fusionado a un anticuerpo, la construcción de fusión de la invención comprende preferentemente dos copias del polipéptido de la invención. Las dos copias pueden ser dos copias del mismo polipéptido de la invención o de diferentes polipéptidos de la invención y son preferentemente dos copias del mismo polipéptido de la invención. Más preferentemente, las dos copias del polipéptido de la invención pueden fusionarse al extremo N de las dos cadenas ligeras del anticuerpo, el extremo C de las dos cadenas ligeras del anticuerpo, el extremo N de las dos cadenas pesadas del anticuerpo o el extremo C de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Se han descrito ampliamente ejemplos de Fynómeros que se fusionan a anticuerpos monoclonales, creando los denominados Fynomabs, que tienen doble especificidad, y la preparación de los mismos, por ejemplo, en (por ejemplo, Silacci et al., 2016, *mAbs* 8: 1, 141-149; Brack et al., 2014, *Mol Cancer Ther* 13 (8): págs. 2030-9; documento WO 2014/044758 A1; documento WO 2014/170063 A1; documento WO 2015/141862 A1).

Una construcción de fusión de acuerdo con la presente invención que comprende el polipéptido de la invención fusionado a un anticuerpo puede obtenerse *ex vivo* o *in vitro* juntando, en condiciones adecuadas, las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos de un anticuerpo observando que el polipéptido de la invención se fusiona al menos a una de estas cadenas. El experto en la materia conoce las condiciones adecuadas. Dicho juntamiento en condiciones adecuadas proporciona el ensamblaje no covalente desencadenado por las interacciones entre las cadenas ligeras del anticuerpo y las cadenas pesadas del anticuerpo. Preferentemente, hay presentes enlaces disulfuro como se encuentran habitualmente en los anticuerpos en una construcción de la invención de este tipo. Los enlaces disulfuro están normalmente presentes en la proximidad de la región bisagra y conectan dos cadenas pesadas y/o una cadena ligera y una cadena pesada. Por ejemplo, dichas construcciones pueden prepararse mediante expresión recombinante convencional en células de mamífero y, normalmente, después se secretan de las células proteínas de fusión intactas de la invención que comprenden anticuerpos intactos y apareados.

De acuerdo con determinadas realizaciones no limitantes del segundo aspecto de la invención, el anticuerpo se dirige contra una diana seleccionada entre el grupo que consiste en GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 y CEACAM-1.

5 El compuesto adicional de la invención también puede comprender una cadena ligera de anticuerpos, una cadena pesada de anticuerpos o un anticuerpo que se dirige contra una diana seleccionada entre el grupo que consiste en GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 o CEACAM-1.

10 Como se ha analizado anteriormente en el presente documento, la sobreexpresión de FGFR3 se ha documentado en varios tipos de cáncer. También se ha documentado la sobreexpresión de GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 y CEACAM-1 en varios tipos de cáncer. Por esta razón, se espera que las construcciones de fusión biespecíficas que son capaces de unir FGFR3b/3c como primera diana, así como una segunda diana que es un compuesto seleccionado entre GM-2, 15 CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 y CEACAM-1 sean particularmente adecuadas para el tratamiento del cáncer y enfermedades relacionadas.

20 El compuesto adicional descrito anteriormente en el presente documento puede fusionarse directamente al polipéptido de la invención o a través de un enlazador. En consecuencia, el polipéptido puede fusionarse (directamente), por ejemplo, al extremo C-terminal del compuesto adicional, más específicamente mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxi del aminoácido C-terminal y el grupo amino del aminoácido N-terminal, o puede conectarse al extremo C-terminal de la cadena del compuesto adicional a través de un enlazador.

25 Los enlazadores adecuados están a disposición del experto. El enlazador de acuerdo con la invención puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en alquilo con 1 a 30 átomos de carbono, polietilenglicol con 1 a 20 restos etileno, polialanina con 1 a 20 restos, ácido caproico, poli-p-fenileno sustituido o sin sustituir y triazol. Se da preferencia a los enlazadores peptídicos, más específicamente a los oligopéptidos que tienen una longitud de 1 a 30 aminoácidos. Los intervalos de longitud preferidos son de 5 a 15 aminoácidos.

30 Se prefieren en particular los enlazadores que son péptidos que consisten en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de aminoácidos pequeños tales como glicina, serina y alanina. Se prefieren en particular los enlazadores que consisten en glicinas y serinas solamente. Un ejemplo no limitante de un enlazador adecuado es un enlazador (G₄S)₃ (3 repeticiones de Gly-Gly-Gly-Ser).

35 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención, o la construcción de fusión de la invención, o una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de fusión de la invención.

40 La una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de la invención pueden ser, por ejemplo, dos moléculas de ácido nucleico en las que una molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera de un anticuerpo y la otra molécula de ácido nucleico, la cadena pesada de un anticuerpo. Como se ha analizado anteriormente, el polipéptido de la invención en este caso puede fusionarse a la cadena ligera o pesada, en posición C-terminal o N-terminal.

45 Las moléculas de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, incluyen ADN, tal como ADNc, y ARNm, así como PNA. Se incluyen adicionalmente moléculas miméticas de ácido nucleico conocidas en la técnica, tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos, tanto cadenas sentido como antisentido. Pueden contener bases nucleotídicas adicionales no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. En una realización preferida, el polinucleótido o la una o más moléculas de ácido nucleico son ADN. Dichas moléculas miméticas de ácido nucleico o derivados de ácido nucleico de acuerdo con la invención 50 incluyen ácido nucleico de fosforotioato, ácido nucleico de fosforamidato, ácido 2'-O-metoxietil ribonucleico, ácido morfolino nucleico, ácido nucleico de hexitol (HNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA) (véase, por ejemplo, Braasch y Corey, *Chemistry & Biology* 8, 1-7 (2001)). LNA es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está restringido por un enlace de metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'.

55 En aquellas realizaciones en las que la molécula de ácido nucleico comprende (en lugar de consiste en) la secuencia citada, los nucleótidos adicionales se prolongan sobre la secuencia específica en el extremo 5' o el extremo 3' o ambos.

60 Las secuencias heterólogas adicionales pueden incluir promotores heterólogos que se unen operativamente a las secuencias codificantes de las moléculas anteriores. Por tanto, la molécula de ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor. Los promotores son bien conocidos por el experto y se usan habitualmente en la técnica. Un ejemplo no limitante es el promotor temprano inmediato de CMV, que normalmente impulsa una fuerte expresión en células de mamíferos.

65

La presente invención también se refiere a uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de la invención, así como a una o más células hospedadoras que comprenden la una o más moléculas de ácido nucleico de la invención o el uno o más vectores de la invención.

- 5 Además, la invención se refiere a una célula, preferentemente una célula aislada, que comprende la molécula de ácido nucleico o vector de la invención. Esta célula también se denomina célula hospedadora.

Los vectores y las células aisladas, en particular las células hospedadoras, pueden ser de cualquier tipo convencional que se adapte al fin, por ejemplo, la producción de polipéptidos y/o construcciones de fusión de la invención, y/o
10 vectores y células hospedadoras terapéuticamente útiles. El experto será capaz de seleccionar esos vectores y células hospedadoras de la técnica y confirmar su idoneidad particular para el fin deseado mediante métodos habituales y sin una carga excesiva.

El uno o más vectores de la invención comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y son preferentemente
15 capaces de producir un polipéptido o proteína de fusión de la invención. En determinadas realizaciones, dichos vectores se seleccionan entre el grupo que consiste en vectores pQE, vectores pET, vectores pFUSE, vectores pUC, vectores YAC, vectores de fagémidos, vectores de fagos, vectores utilizados para terapia génica tales como retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados. Para obtener técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. En general, los vectores
20 pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, SV40 vírico y M13.

25 La una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden insertarse en uno o más vectores de manera que se genere una fusión traduccional con otra molécula de ácido nucleico. La otra molécula de ácido nucleico puede codificar, por ejemplo, la cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo y/o un enlazador, cuyos ejemplos preferidos se han descrito anteriormente en el presente documento.

30 La una o más células hospedadoras pueden producirse mediante la introducción de una o más moléculas de ácido nucleico o uno o más vectores de la invención en la una o más células hospedadoras que, en su presencia, median la expresión de los polipéptidos codificados por dichas moléculas de ácido nucleico o vectores. Las células hospedadoras son preferentemente células hospedadoras aisladas, lo que significa que las células no están dentro del contexto de un organismo vivo. El hospedador puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Un hospedador eucariota
35 adecuado puede ser una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, una célula fúngica o una célula vegetal. Una célula eucariota puede ser una célula de insecto tal como una célula de *Spodoptera frugiperda*, una célula de levadura tal como una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, una célula fúngica tal como una célula de *Aspergillus* o una célula de vertebrado. En este último aspecto, se prefiere que la célula sea una célula de mamífero tal como, por ejemplo, una célula humana, una célula de hámster o una
40 célula de mono. La célula puede ser parte de una estirpe celular.

Son ejemplos adecuados de procariotas/bacterias aquellos utilizados generalmente para la clonación como *E. coli* (por ejemplo, cepas de *E. coli* HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 y JM101).

45 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el polipéptido de la invención, la construcción de fusión de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención o cualquier combinación de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden preferentemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga, un
50 diluyente, un material encapsulante o una formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos, sólidos, semisólidos o líquidos. Se describen ejemplos de vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999.

55 Como se ha analizado con más detalle anteriormente en el presente documento, FGFR3 está implicado en muchas enfermedades y, en particular, el cáncer. En consecuencia, el polipéptido, la construcción de fusión, la molécula de ácido nucleico, el vector de la invención, o cualquier combinación de los mismos, son útiles como medicamento. Dentro de dicha composición farmacéutica, el polipéptido, la construcción de fusión, las moléculas de ácido nucleico, el vector
60 de la invención, o cualquier combinación de los mismos, pueden ser el único agente activo, pero como alternativa también podrían combinarse con otros agentes activos, tal como en productos de combinación. La composición farmacéutica puede administrarse, por ejemplo, a mamíferos tales como animales domésticos y animales de compañía, ratones, ratas, conejos, primates no humanos y similares. Preferentemente se administra a seres humanos. Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento se administrarán al sujeto a una dosis
65 adecuada.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede formularse de manera convencional de acuerdo con métodos que se encuentran en la técnica, usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicos, véase, por ejemplo, Ansel et al., "*Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. La composición farmacéutica puede, en consecuencia, administrarse por vía oral, por vía parenteral, tal como por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía transdérmica, por vía transmucosa, por vía subdural, por vía local o por vía tópica a través de iontoforesis, por vía sublingual, por pulverización de inhalación, aerosol o por vía rectal y similares en formulaciones unitarias de dosificación que comprenden opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales. Además, las composiciones de diagnóstico de la invención pueden fabricarse de cualquier manera convencional.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse como el único principio activo o junto con otro principio activo, tal como agentes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los polipéptidos, las construcciones de fusión y las construcciones de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales con afinidad a GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 o CEACAM-1.

La composición de diagnóstico de la invención es útil en la detección de un nivel fisiológico no deseado de FGFR3, en particular debido a una sobreexpresión no deseada de FGFR3. Dicha detección normalmente comprende poner en contacto una muestra con el polipéptido, la construcción de fusión, la construcción, la molécula de ácido nucleico, el vector, la célula hospedadora de la invención, o cualquier combinación de los mismos, y detectar la presencia de un FGFR3b y 3c, en particular FGFR3b y 3c de las SEQ ID NO 9 y 10 en la muestra. En consecuencia, la composición de diagnóstico de la invención puede usarse para evaluar el inicio o el estado de la enfermedad y, en particular, el cáncer o una enfermedad relacionada que se asocia a la sobreexpresión de FGFR3.

En una realización de la presente invención descrita anteriormente en el presente documento, el polipéptido de la invención se une a un colorante fluorescente, un fotosensibilizador, un radionúclido o un agente de contraste para la formación de imágenes médicas. Dichas construcciones de fusión son particularmente adecuadas para aplicaciones de diagnóstico. Esto se debe a que FGFR3, por ejemplo, se sobreexpresa en el cáncer, de manera que puede usarse un polipéptido marcado de manera detectable de la invención para obtener imágenes de un sitio del cuerpo enfermo, diagnosticando de este modo que un sujeto tiene cáncer.

La dosificación de las composiciones de diagnóstico y farmacéuticas de la invención variará dependiendo del polipéptido particular, la construcción de fusión, la construcción, una o más moléculas de ácido nucleico, uno o más vectores de la invención, o cualquier combinación de los mismos, el grupo de pacientes o el paciente individual, la presencia opcional de compuestos adicionales activos diagnósticamente o médicamente y la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se ha de diagnosticar o tratar. Normalmente, la composición de diagnóstico o farmacéutica se usa en dosificaciones de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. Las composiciones de diagnóstico o farmacéuticas pueden administrarse más de una vez, por ejemplo, para controlar el curso de una enfermedad en el caso de una composición de diagnóstico o para prolongar el tratamiento en el caso de una composición farmacéutica. Por ejemplo, la frecuencia de administración de la composición de diagnóstico o farmacéutica puede estar en el intervalo de desde a diario hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, por ejemplo, desde aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo, una vez cada 4 a 8 semanas. En determinadas realizaciones, una pauta de dosificación implica la administración de las composiciones diagnósticas o farmacéuticas de la invención una vez al mes a una vez cada 2 a 3 meses, o con menos frecuencia.

De acuerdo con determinadas realizaciones, la composición farmacéutica o de diagnóstico del cuarto aspecto de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad mediada por linfocitos T.

Como se ha analizado anteriormente en el presente documento, se ha publicado la sobreexpresión de FGFR3 en varios tipos de cáncer, de manera que las composiciones farmacéuticas o de diagnóstico son particularmente adecuadas para tratar y diagnosticar el cáncer. Por tanto, el cáncer es preferentemente un cáncer, en el que la célula cancerosa expresa FGFR3 en su superficie o un cáncer que se asocia a la sobreexpresión de FGFR3.

Debido al papel conocido de la expresión de FGFR3 en el cáncer, la composición farmacéutica o de diagnóstico de la invención también puede usarse en el tratamiento de neoplasias en general, incluyendo tumores benignos y malignos.

Se ha publicado en el documento US 2008/044419 que la inhibición de la actividad de FGFR3 es un medio de tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T, en particular, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por linfocitos T.

De acuerdo con determinadas realizaciones del cuarto aspecto de la invención, el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de testículo y cáncer urotelial.

De acuerdo con "*The human protein Atlas*" (véase <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000068078-FGFR3/cancer>) se descubrió la expresión de FGFR3 en los siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de testículo y cáncer urotelial. Por tanto, puede esperarse que la expresión de FGFR3 tenga una implicación en el desarrollo de estos tipos de cáncer.

De acuerdo con determinadas realizaciones del cuarto aspecto de la invención, el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células escamosas y cáncer colorrectal.

Se ha analizado anteriormente en el presente documento que la sobreexpresión de FGFR3 se ha publicado en el mieloma múltiple así como en el cáncer de vejiga. La expresión de FGFR3 también está implicada en el cáncer de cuello uterino (Capellen et al., *Nat Genet.* Septiembre de 1999; 23 (1): 18-20.), cáncer pancreático (Lafitte et al., *Mol Cancer*, 2013, 12: 83) y cáncer colorrectal (Sonvilla et al., *Br J Cancer*, 2010; 102 (7): 1145-1156). Además, se observó la expresión de FGFR3 en el cáncer de pulmón de células escamosas (Liao et al. (2013), *Cancer Research*, 73 (16): 5195-5205).

De acuerdo con determinadas realizaciones del cuarto aspecto de la invención, la enfermedad mediada por linfocitos T se selecciona entre artritis reumatoide (AR), artritis por colágeno II, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), psoriasis, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveítis autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad celíaca y miastenia grave.

Las enfermedades enumeradas anteriormente son ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por linfocitos T particulares que pueden tratarse mediante la inhibición de FGFR3.

En la presente memoria descriptiva, se citan varios documentos que incluyen solicitudes de patente y manuales del fabricante. La divulgación de estos documentos, aunque no se considera pertinente para la patentabilidad de la presente invención, se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Más específicamente, todos los documentos referenciados se incorporan por referencia en la misma medida que si cada documento individual se indicase específica e individualmente para incorporarse por referencia.

A lo largo de la presente invención, la expresión "que comprende" significa que todos los elementos enumerados están incluidos. Cuando se usa esta expresión, también pueden haber presentes opcionalmente elementos adicionales, no nombrados. Por tanto, "que comprende" puede significar "que consiste en" (es decir, solo están presentes los elementos enumerados) o puede significar "que contiene" (es decir, también están presentes otros elementos además de todos los elementos enumerados). Por tanto, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: x puede consistir en la SEQ ID NO: x solamente, o puede en otras realizaciones comprender aminoácidos adicionales, tal como, por ejemplo, en una proteína de fusión, por ejemplo, en realizaciones en las que la SEQ ID NO: x se fusiona a un anticuerpo de cadena pesada o ligera.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que habitualmente entiende un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones.

Con respecto a las realizaciones caracterizadas en la presente memoria descriptiva, en particular en las reivindicaciones, se pretende que cada realización mencionada en una reivindicación dependiente se combine con cada realización de cada reivindicación (independiente o dependiente) de la que depende dicha reivindicación dependiente. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación independiente 1 que cite 3 alternativas A, B y C, una reivindicación dependiente 2 que cite 3 alternativas D, E y F y una reivindicación 3 dependiente de las reivindicaciones 1 y 2 y que cite 3 alternativas G, H e I, ha de entenderse que la memoria descriptiva desvela inequívocamente realizaciones correspondientes a las combinaciones A, D, G; A, D, H; A, D, I; A, E, G; A, E, H; A, E, I; A, F, G; A, F, H; A, F, I; B, D, G; B, D, H; B, D, I; B, E, G; B, E, H; B, E, I; B, F, G; B, F, H; B, F, I; C, D, G; C, D, H; C, D, I; C, E, G; C, E, H; C, E, I; C, F, G; C, F, H; C, F, I, a menos que se mencione específicamente lo contrario.

De forma similar, y también en aquellos casos en los que las reivindicaciones independientes y/o dependientes no citen alternativas, se entiende que si las reivindicaciones dependientes se refieren a la mayoría de las reivindicaciones anteriores, cualquier combinación de la materia objeto cubierta por las mismas se considerará desvelada explícitamente. Por ejemplo, en el caso de una reivindicación independiente 1, una reivindicación dependiente 2 que

se refiere a la reivindicación 1 y una reivindicación dependiente 3 que se refiere a las reivindicaciones 2 y 1, se deduce que la combinación de la materia objeto de las reivindicaciones 3 y 1 se desvela clara e inequívocamente al igual que la combinación de la materia objeto de las reivindicaciones 3, 2 y 1. En caso de que haya presente una reivindicación dependiente 4 adicional que se refiera a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, se deduce que la combinación de la materia objeto de las reivindicaciones 4 y 1, de las reivindicaciones 4, 2 y 1, de las reivindicaciones 4, 3 y 1, así como de las reivindicaciones 4, 3, 2 y 1, se desvela de forma clara e inequívoca.

Las consideraciones anteriores se aplican haciendo los cambios necesarios a todas las reivindicaciones adjuntas.

Las figuras muestran:

Fig. 1: Alineación de los Fynómeros anti-FGFR3 de las SEQ ID NO 3 a 8.

Fig. 2: Propiedades de internalización de los Fynómeros anti-FGFR3.

Fig. 3: Perfiles de exclusión por tamaño de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn: A) FF2L4C3 – SEQ ID NO. 3; B) FF44L65G12 - SEQ ID NO. 4; C) FF44L65G7 - SEQ ID NO. 5; D) FF48L66G7 - SEQ ID NO. 6; E) FF43L65D5 - SEQ ID NO. 7; F) FF44L65B7 - SEQ ID NO. 8.

Fig. 4: Unión por FACS de polipéptidos derivados de Fyn-SH3 que se unen a FGFR3 a: A) células KMS-11 positivas para FGFR3 y B) células N87 negativas para FGFR3.

Fig. 5: ELISA de especificidad de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn: A) FF2L4C3 – SEQ ID NO. 3; B) FF44L65G12 - SEQ ID NO. 4; C) FF44L65G7 - SEQ ID NO. 5; D) FF48L66G7 - SEQ ID NO. 6; E) FF43L65D5 - SEQ ID NO. 7; F) FF44L65B7 - SEQ ID NO. 8. Antígenos sometidos a ensayo: huFGFR3b = variante b de corte y empalme de FGFR3 humano; huFGFR3c = variante c de corte y empalme de FGFR3 humano; cyFGFR3c = variante c de corte y empalme de FGFR3 de macaco; muFGFR3c = variante c de corte y empalme de FGFR3 murino; huFGFR3-D1 = dominio 1 de FGFR3 humano; huFGFR3-D2 = dominio 2 de FGFR3 humano; huFGFR3-D1D2 = dominio 1 y dominio 2 de FGFR3 humano; IgG = mezcla de IgG policlonal humana; PBS = solución salina tamponada con fosfato.

Fig. 6: Ensayo de internalización que muestra el efecto citotóxico de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Polipéptidos derivados de SH3 de Fyn que se unen a FGFR3b y FGFR3c.

Con el objetivo de poder dirigirse a FGFR3, los presentes inventores se propusieron obtener moléculas de unión derivadas de SH3 de Fyn específicas para ello. Puesto que la distribución y la expresión de las dos variantes de corte y empalme diferentes (FGFR3b y FGFR3c) en diferentes células tumorales no se comprende completamente, es importante que los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn puedan unirse a las dos.

Usando FGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12) y FGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) humanos recombinantes como dianas, los inventores seleccionaron y aislaron satisfactoriamente varias familias de proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn que son capaces de unirse a ambas variantes de corte y empalme de FGFR3 humano (SEQ ID NO 9 y 10). Los inventores continuaron con la familia candidata más prometedora para estudios adicionales.

Curiosamente, un polipéptido derivado de SH3 de Fyn denominado FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3), que porta la secuencia del bucle RT "EYVGPTP" (SEQ ID NO: 2), se enriqueció durante el proceso de selección y mostró las propiedades de internalización más prometedoras entre 29 Fynómeros anti-FGFR3 sometidos a ensayo (véase la Fig. 2). En más detalle, se excluyeron otras 5 familias de secuencias de un análisis posterior. Los Fynómeros que pertenecían a la familia de secuencias más prometedora mostraron las mejores afinidades y propiedades de internalización.

Con el fin de obtener proteínas de unión de FGFR3 derivados de SH3 de Fyn con afinidades mayores y propiedades de internalización mejoradas, se usó FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3) como molde para la maduración de afinidad. La secuencia de bucle RT "EYVGPTP" (SEQ ID NO: 2) se mantuvo constante y se combinó con un repertorio aleatorizado de bucle n-src (donde se introdujo un tramo de 4 a 6 restos de aminoácidos aleatorizados en las posiciones (X¹) a (X⁴) en la SEQ ID NO: 1). El proceso de generación de la biblioteca de maduración de afinidad fue esencialmente el mismo que el descrito para la clonación de la biblioteca virgen con un bucle n-src aleatorizado ("biblioteca 0" como se describe en [25]).

Después de las selecciones de péptidos vírgenes y de maduración de afinidad, los polipéptidos enriquecidos derivados de SH3 de Fyn se cribaron para la unión a FGFR3 mediante ELISA de lisado. Se clonaron ADN que codificaban las proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn en el vector de expresión bacteriano pQE12 (Qiagen) de manera que las

construcciones resultantes portaban un marcador de mic-hexahistidina C-terminal como se describe en Grabulovski et al. [26]. Los polipéptidos se expresaron en el citosol de la bacteria *E. coli* en un formato de 96 pocillos y se prepararon 200 µl de lisado aclarado por pocillo como se describe en Bertschinger et al. [27]. En resumen, se escogieron colonias bacterianas transformadas de la placa de agar y se cultivaron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc, N.º de cat. 163320) en 200 µl de medio 2xYT que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 0.1 % (p/v). Se indujo expresión de proteínas después del crecimiento durante 3 h a 37 °C y agitación rotativa a 200 rpm mediante la adición de IPTG 1 mM (Applichem, Alemania). Se expresaron proteínas durante la noche en un agitador rotativo (200 rpm, 30 °C). Posteriormente, la placa de 96 pocillos se centrifugó a 1800 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos bacterianos se lisaron usando BugBuster® más Benzonase® (Millipore 70750-3) y los lisados se aclararon posteriormente por centrifugación durante 10 min a 1800 x g. Se mezclaron 60 µl de lisado con 170 µl de PBS y se filtraron a través de una placa de filtro Multiscreen de 0.45 µm (Millipore MSHVN4510), con el fin de eliminar cualquier resto bacteriano residual.

Se usaron lisados bacterianos monoclonales para ELISA. Para el ELISA, se recubrieron placas Maxisorp durante la noche con huFGFR3b-Fc 5 µg/ml (SEQ ID NO: 12), huFGFR3c-Fc 5 µg/ml (SEQ ID NO: 13) o poli IgG 5 µg/ml y se bloquearon durante al menos 1 h con MPBS al 2 %. Se añadieron lisados aclarados que contenían Fynómero soluble con un marcador peptídico de myc y hexahistidina C-terminal en MPBS al 2 % que contenía anticuerpo anti-marcador tag monoclonal murino, clon 9E10 (Roche Applied Science 11 667 203 001) a las placas maxisorp. Se detectó el Fynómero unido a través de 9E10 mediante un conjugado de anti-IgG de ratón-peroxidasa de rábano picante (Sigma-Aldrich A2554). La detección de actividad de peroxidasa se realizó mediante la adición de sustrato BM blue POD (Roche) y la reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M.

La secuencia de ADN de las proteínas de unión específicas se verificó por secuenciación de ADN.

Resultados

Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos preferidos derivados de SH3 de Fyn positivas para ELISA que se unen a FGFR3b y FGFR3c se presentan en las SEQ ID NO: 3 a 8 como se adjunta en el listado de secuencias. Las secuencias de polipéptidos derivados de Fyn-SH3 SEQ ID NO: 4 a 8 son una selección de proteínas de unión de un gran conjunto de moléculas que se obtuvieron después de la maduración de afinidad de FF2L4C3 (SEQ ID NO: 3) y se presentan en el presente documento debido a sus afinidades y propiedades de internalización mejoradas (como se muestra en los ejemplos 2 y 5).

Con más detalle, se caracterizaron más de 80 Fynómeros derivados de la SEQ ID NO: 3 con respecto a sus propiedades biofísicas, afinidades y propiedades de internalización. Las SEQ ID NO: 4 a 8 son las proteínas de unión con el mejor conjunto de propiedades en términos de biofísica, afinidades e internalización.

Ejemplo 2: Expresión de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn de la invención

Este ejemplo muestra los rendimientos de expresión de los polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn preferidos y la caracterización de estos polipéptidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Métodos

a) Rendimientos de expresión de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn

Se expresaron polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn en el citosol de la bacteria TG1 *E. coli* y se purificaron como se describe en Grabulovski et al. [2].

b) Cromatografía de exclusión por tamaño (CET)

Se analizaron muestras mediante cromatografía de exclusión por tamaño (TOSOH TSKgel PW G3000PWxL; Agilent 1260 Infinity HPLC; fase móvil PBS pH 7.4). Se inyectaron 10 µl de muestra sin diluir en la columna y se analizaron los perfiles resultantes.

Resultados

a) Rendimientos de expresión

Los rendimientos de expresión para polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn monoméricos de la invención variaron de 15 a 51 mg/litro de cultivo bacteriano en condiciones no optimizadas en matraces de agitación (Tabla 1) y están en intervalo típico para un polipéptido derivado de SH3 de Fyn.

Tabla 1. Rendimientos de expresión de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn producidos en bacterias TG1 *E. coli*

Fynúmero	SEQ ID NO	Rendimiento (mg/l)
FF2L4C3	3	18
FF44L65G12	4	37
FF44L65G7	5	15
FF48L66G7	6	58
FF43L65D5	7	32
FF44L65B7	8	51

5 b) Cromatografía de exclusión por tamaño (CET)

Los perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño (CET) demostraron que todas las construcciones se eluyeron principalmente como picos monoméricos individuales (Fig. 3). Esto generalmente indica buenas propiedades biofísicas, lo que es ventajoso desde la perspectiva de fabricación de Fynómeros (moléculas de unión derivadas de SH3 de Fyn, incluyendo Fynomabs, que son proteínas de fusión con anticuerpos) y está en línea con observaciones anteriores de moléculas derivadas de SH3 de Fyn.

Ejemplo 3: Los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención se unen a FGFR3b y FGFR3c humanos con altas afinidades.

Este ejemplo muestra la caracterización de los polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn preferidos mediante resonancia de plasmón superficial y experimentos de citometría de flujo.

Métodos

a) Mediciones de afinidad por BIAcore

Se midieron afinidades usando un instrumento BIAcore T200. Se recubrió una célula de flujo en un CM5 de la serie chip S (GE Healthcare BR-1005-30) con el anticuerpo anti – myc 9E10 (Roche 11 667 203 001; densidad de recubrimiento que variaba entre 6000 y 8000 UR) usando el kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare BR100633).

El Fynúmero FF2L4C3 parental (SEQ ID NO: 3), a una concentración de 500 nM y los Fynómeros con las SEQ ID NO: 4-8, a una concentración de 100 nM, se capturaron en la superficie 9E10 seguido de inyecciones de concentraciones diferentes de huFGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12), huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) o cynoFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 14) (0 nM, 3.9 nM, 7.8 nM, 15.6 nM, 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM para las mediciones del Fynúmero FF2L4C3 parental, 0 nM, 0.046 nM, 0.14 nM, 0.41 nM, 1.2 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM y 100 nM para los Fynómeros con las SEQ ID NO: 4 - 8). Se registraron sensogramas y se determinaron las constantes cinéticas aparentes mediante el ajuste de la curva usando el modelo de interacción Langmuir 1.1 en el software BIAevaluation 2.1.

b) Mediciones de afinidad por citometría de flujo

Se analizó la unión de los Fynómeros a huFGFR3 en las células por citometría de flujo usando células KMS-11 (JCRB1179) como células positivas para FGFR3 y N87 (ATCC, CRL-5822) como una estirpe celular de control negativa para FGFR3. Ambas células KMS-11 y N87 se mantuvieron en medio RPMI1640 (Invitrogen 52400-25). Todos los medios fueron suplementados con penicilina 25 U/ml, estreptomicina 25 µg/ml y FCS al 10 %. Para recoger las células KMS-11 semi-adherentes de un matraz T150, el sobrenadante se retiró en un tubo falcon de 50 ml y las células se lavaron con 10 ml de PBS, que también se añadió al tubo falcon. Se añadieron 2 ml de Accutase (Sigma A6964) al matraz y se incubaron durante 10 min a 37 °C. La Accutase se inactivó con la adición de 10 ml de medio y se añadió al tubo falcon, que después se centrifugó (250 x g, 5 min) para sedimentar las células. Las células se resuspendieron en tampón FACS (PBS + FCS al 1 % + azida sódica al 0.2 %) a una concentración celular de 1×10^6 células/ml y se usaron 100 µl por pocillo (1×10^5 células/pocillo) para la tinción de citometría de flujo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc 163320). Para las células N87 adherentes, el sobrenadante y el lavado se descartaron y solo se recogieron y prepararon las células desprendidas por Accutase.

Los Fynómeros se co-incubaron con el anticuerpo anti-myc de ratón (clon 9E10; Roche 11667149001) para permitir el entrecruzamiento de Fynómeros marcados con myc antes de la unión a las células. Los Fynómeros se diluyeron a 1 µM y se co-incubaron con anticuerpo anti-myc 9E10 667 nM (relación molar 3:2) en tampón FACS, durante aproximadamente 10 minutos en hielo.

Esta mezcla se diluyó en serie 1 en 4 hasta una concentración de Fynúmero de 0.06 nM (8 concentraciones en total).

Los controles incluyeron solo el anticuerpo secundario 9E10 (sin Fynómero; 9E10 667 nM), solo células (solo tampón FACS) y un anticuerpo anti-FGFR3 (R&D systems; N.º de cat. MAB766) a una concentración de 10 nM. Las células se centrifugaron en la placa de 96 pocillos (250 x g, 5 min) y se resuspendieron con las muestras indicadas anteriormente, antes de la incubación en hielo durante 1 h. La placa se centrifugó y se lavó (PBS + azida sódica al 0.2 %), antes de volver a centrifugar. Después, se añadieron 50 µl del anticuerpo secundario anti-mIgG Alexa488 (Life Technologies A21202) a las células a una concentración de 4 µg/ml, antes de incubar en la oscuridad, en hielo, durante 45 min. La placa se centrifugó y se lavó dos veces con PBS + azida sódica al 0.2 %, antes de resuspender en tampón FACS y análisis FACS (Millipore Guava easyCyte 8HT).

- 10 El análisis de datos de FACS se realizó usando Prism 6. Los datos se transformaron ($X = \log X$) y se analizaron usando un ajuste no lineal, log(agonista) frente a respuesta - Pendiente variable (4 parámetros).

Resultados

- 15 a) Mediciones de afinidad por BIAcore

Las propiedades de unión se analizaron mediante análisis de interacción en tiempo real en un chip BIAcore que reveló las siguientes constantes de disociación (KD) para polipéptidos de unión a FGFR3 seleccionados:

- 20 Tabla 2. Constantes cinéticas aparentes de la unión de polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn a FGFR3b humano recombinante, FGFR3c humano y FGFR3c de macaco.

Fynómero	SEQ ID NO.	KD _{ap} de huFGFR3b (pM)	KD _{ap} de huFGFR3c (pM)	KD _{ap} de cyFGFR3c (pM)
FF2L4C3	3	4700	4600	5900
FF44L65G12	4	690	685	110
FF44L65G7	5	470	335	280
FF48L66G7	6	260	190	210
FF43L65D5	7	335	230	160
FF44L65B7	8	100	250	260

- 25 Las afinidades aparentes medidas (Tabla 2) de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn (SEQ ID NO: 3 a 8) que se unen a FGFR3b y FGFR3c (SEQ ID NO 9 y 10) son sorprendentemente altas teniendo en cuenta el hecho de que se obtuvieron valores sub-nanomolares después de solo una ronda de maduración de afinidad. Además, estas mediciones confirmaron las propiedades de unión comparables de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn (SEQ ID NO: 3 a 8) a ambas isoformas humanas de FGFR3 (FGFR3b y FGFR3c; SEQ ID NO 9 y 10) y a FGFR3c de macaco (la unión a FGFR3b de macaco no se sometió a ensayo).

- 30 b) Mediciones de afinidad por citometría de flujo

- 35 Las propiedades de unión se analizaron por citometría de flujo usando células KMS-11 positivas para FGFR3 y células N87 negativas para FGFR3 como control negativo. Los siguientes valores de CE50 para polipéptidos de unión a FGFR3 seleccionados se midieron como se muestra en la Tabla 3 y la Fig. 4.

Tabla 3. Valores de CE50 determinados en células KMS-11 positivas para FGFR3 para polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn.

Fynómero	SEQ ID NO	CE50 (nM)
FF2L4C3	3	5.9
FF44L65G12	4	2.2
FF44L65G7	5	4.2
FF48L66G7	6	2.3
FF43L65D5	7	1.2
FF44L65B7	8	0.6

- 40 Los valores de CE50, en el intervalo nanomolar bajo (Tabla 3), medidos en una estirpe celular que expresaba FGFR3 (Fig. 4A, KMS-11) confirmaron las afinidades aparentes altas medidas por resonancia de plasmón superficial (Tabla 2) y demostraron la unión a FGFR3 en el contexto natural de una superficie celular. Todos los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn (SEQ ID NO: 3 a 8) que se unieron a FGFR3 no mostraron una unión inespecífica en una estirpe celular que no expresaba FGFR3 (Fig. 4B).

- 45 **Ejemplo 4: Los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención específicos para FGFR3 no interfieren con la unión al ligando**

Se prefiere que los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn para la unión a ambas isoformas FGFR3b y FGFR3c no

interfieran con la unión al ligando (por ejemplo, FGF1), ya que el sitio de unión al ligando se ubica en la proximidad del sitio de corte y empalme y da lugar a FGFR3b o FGFR3c.

Con el fin de verificar la capacidad de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn para unirse a FGFR3 en presencia de uno de sus ligandos, se estableció un experimento BIAcore para medir la afinidad de los Fynómeros a FGFR3 en presencia o ausencia de FGF1 (el factor de crecimiento de fibroblastos 1 es uno de los principales ligandos de FGFR3).

En analogía con el método utilizado para medir las afinidades (como se describe en el Ejemplo 3) se capturaron Fynómeros a una concentración de 100 nM (con la excepción de FF2L4C3 – SEQ ID NO. 3 utilizado a una concentración de 500 nM) en la superficie de 9E10 seguido de inyecciones de diferentes concentraciones de huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) (0 nM, 11 nM, 33 nM, 100 nM) en presencia o ausencia de FGF1 200 nM (R&D systems 232-FA-025/CF). Se registraron sensogramas y se calcularon las constantes cinéticas aparentes usando el software BIAevaluation 2.1.

Resultados

Independientemente de la presencia o ausencia de FGF1 200 nM en solución, la unión de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn a huFGFR3c no cambió, lo que demuestra que la unión de los Fynómeros a FGFR3 no interfirió con la unión del ligando.

Tabla 4: Muestra las constantes cinéticas obtenidas en presencia o ausencia de FGF1 200 nM.

Fynómero	SEQ ID NO.	KD _{ap} (pM) para huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13)	KD _{ap} (pM) para huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13) en presencia de FGF1 200 nM
FF2L4C3	3	4000	3800
FF44L65G12	4	140	120
FF44L65G7	5	320	230
FF48L66G7	6	170	130
FF43L65D5	7	60	70
FF44L65B7	8	170	130

Aunque, debido a la variabilidad del ensayo, los valores de KD_{ap} en ausencia de FGF1 son ligeramente diferentes a los valores obtenidos en el experimento que se muestra en el Ejemplo 2 (Tabla 2), este experimento muestra que los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn son capaces de unirse al FGFR3 incluso si el ligando (en este caso FGF1) está unido al sitio de unión al ligando.

A partir de esto, los inventores concluyeron que el epítipo unido por los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn que se describen en el presente documento se ubica en una región constante de FGFR3.

Ejemplo 5: Los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención se unen a los dominios D1-D2 de FGFR3.

La especificidad de los polipéptidos derivados de Fyn-SH3 que se unen a FGFR3 se sometió a ensayo mediante ELISA.

Se recubrieron diferentes antígenos en la placa (placa Maxisorp; Nunc 439454): huFGFR3b-Fc (SEQ ID NO: 12), huFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 13), cyFGFR3c-Fc (SEQ ID NO: 14), muFGFR3c-His (SEQ ID NO: 15), huD1-Fc (SEQ ID NO: 16), huD2-Fc (SEQ ID NO: 17), huD1-D2-Fc (SEQ ID NO: 18).

La placa se recubrió con 100 µl de antígeno a 5 µg/ml (0.5 µg/pocillo) y se incubó a 4 °C durante la noche. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS antes de bloquearlos con 200 µl de MPBS al 4 % durante 1 h a TA. Los pocillos se lavaron nuevamente y se añadieron 20 µl de MPBS al 10 % que contenían 9E10 15 µg/ml, antes de la adición de 80 µl de Fynómero a 250 nM (concentración final de Fynómero de 200 nM). Los pocillos se incubaron durante 45 min a TA, antes del lavado y la adición de 100 µl de anti-IgG-HRP de ratón (Sigma A2554) diluido 1:1000 en MPBS al 2 %. Los pocillos se incubaron durante 30 min a TA, antes de lavar 3 veces con Tween-20 al 0.1 % en PBS y después 3 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de sustrato BM POD Blue (Roche 11 484 281 001) a cada pocillo seguido de 50 µl de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción. La absorbancia a 450 nm – 650 nm se registró usando un instrumento Tecan M1000.

Resultados

Como se muestra en la Fig. 5 A-F, todos los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn tienen reacción cruzada con FGFR3c de macaco y murino. Curiosamente, todas las proteína de unión son específicas para un epítipo presente solo cuando los dominios D1 y D2 están unidos físicamente (véase la Fig. 5 A-F barra huFGFR3-D1D2), de hecho, no

se observa unión si los dominios individuales D1 o D2 (hFGFR3-D1 o huFGFR3 -D2) se inmovilizan en la placa de ELISA.

Ejemplo 6: Los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención provocan la internalización eficiente de FGFR3

La internalización es una característica central de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn que se describen en el presente documento y proporciona la oportunidad de usar estas proteínas de unión para entregar cargas tóxicas y/o proteínas fusionadas tales como anticuerpos intracelularmente.

Con el fin de evaluar la capacidad de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn que se unen a FGFR3 para internalizarse tras la unión a la diana, se estableció un ensayo de internalización basado en la entrega intracelular de un agente citotóxico.

El ensayo mide el efecto citotóxico de los Fynómeros anti-FGFR3 entrecruzados con 9MA10 conjugado con MMAF (Monometil auristatina F), en células KMS-11. MMAF es un agente antimitótico (bloquea la polimerización de la tubulina) y se activa solo tras la internalización en las células. Por tanto, este ensayo indica cuánto facilita el Fynómero la internalización de MMAF. Se sembraron 50 µl de células KMS-11 a 2×10^5 células/ml en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Corning Costar 3610), para proporcionar 10,000 células por pocillo. Las células se incubaron durante 4 horas para permitir que las células se adhieran (37 °C, CO₂ al 5 %). Los Fynómeros y 9E10-MMAF se mezclaron en una relación 3:1. Se preparó una solución madre 4x de Fynómero (4 µM) y una solución madre 4x de 9E10-MMAF (1.33 µM) en medios RPMI (véase la sección 5.4.1) y se mezclaron 1:1 (40 µl + 40 µl). Después, esta mezcla se diluyó en serie 1 en 3, para proporcionar un intervalo de concentraciones de 1000 nM – 50 pM. Se añadieron 50 µl de la muestra a los 50 µl de células (como se sembró anteriormente) y se incubaron durante 5 días (37 °C, CO₂ al 5 %). Se incluyeron controles apropiados, el Fynómero FynSH3 de tipo silvestre, MMAF-9E10 sin Fynómero y también células sin adición de ningún reactivo. Todas las muestras se prepararon por duplicado. Después de 5 días, se añadieron 100 µl de Cell titer glo (Promega G7573) a cada pocillo y se incubaron con agitación suave durante 10 min en la oscuridad. Como lectura de la viabilidad celular, se midió la luminiscencia usando un instrumento Tecan M1000. El análisis se realizó usando Prism 6. Los datos se transformaron ($X = \log X$) y se analizaron usando un ajuste no lineal, log(inhibidor) frente a respuesta – Pendiente variable (4 parámetros).

Resultados

Todos los polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn que se describen en el presente documento muestran una citotoxicidad aumentada (por ejemplo, internalización) en comparación con las células tratadas solo con el anticuerpo secundario marcado con MMAF (9E10 en la Fig. 6A) o el Fynómero FynSH3 de tipo silvestre en combinación con 9E10 marcado con MMAF que se muestra en los 3 experimentos (Fig. 6 A-C indicado como FynSH3), que muestran citotoxicidad solo a la concentración más alta sometida a ensayo, probablemente debido a la toxicidad del propio MMAF. La Fig. 6 muestra los perfiles de citotoxicidad obtenidos en diferentes experimentos y la Tabla 5 muestra la CE50 obtenida para los diferentes polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn.

Tabla 5: Valores de CE50 determinados en ensayos de internalización usando células KMS-11 FGFR3+ para polipéptidos de unión a FGFR3 derivados de SH3 de Fyn.

Fynómero	SEQ ID NO.	CE50 (nM)
FF2L4C3	3	28.5/21/26.4
FF44L65G12	4	2.5
FF44L65G7	5	2.6
FF48L66G7	6	2.4
FF43L65D5	7	0.8
FF44L65B7	8	1.8

Nota: se indican para FF2L4C3 los 3 valores obtenidos en los 3 experimentos que se muestran en la Fig. 6.

Los datos que se muestran en la Fig. 6 y la Tabla 5 muestran que una mayor afinidad también conduce a una internalización más eficiente.

Ejemplo 7: Polipéptido derivado de Fyn-SH3 alternativo que muestra excelentes propiedades de unión e internalización y que deriva de una familia diferente

Además de la familia preferida de secuencias (SEQ ID NO: 1), los inventores identificaron un Fynómero alternativo, FF40L54A5 (SEQ ID NO: 22), que sorprendentemente también muestra excelentes propiedades de unión e internalización y comparte propiedades de fabricación y reactividad cruzada con los Fynómeros derivados de la SEQ ID NO: 1 (véase la Tabla 6). No se esperaba que el Fynómero FF40L54A5 tuviese propiedades de internalización

excelentes ya que su secuencia derivaba de un Fynúmero que solo mostraba propiedades de internalización muy malas.

La Tabla 6 resume las propiedades del Fynúmero FF40L54A5.

Tabla 6 - parte 1

Fynúmero	SEQ ID NO.	Rendimiento (mg/l)	Afinidades medidas por BIAcore		
			KD _{ap} de huFGFR3b (pM)	KD _{ap} de huFGFR3c (pM)	KD _{ap} de cyFGFR3c (pM)
FF40L54A5	22	5.4	170	170*	160

Tabla 6 - parte 2

Fynúmero	SEQ ID NO.	CE50 (nM) para la unión a células KMS-11 FGFR3 ⁺	Afinidades medidas por BIAcore (competencia con FGF1)		CE50 (nM) en ensayo de internalización
			KD _{ap} (pM) para huFGFR3c-Fc	KD _{ap} (pM) para huFGFR3c-Fc en presencia de FGF1 200 nM	
FF40L54A5	22	6.6	210*	230	4.7
*: diferencias debido a la variabilidad experimental					

Tabla 6 - parte 3

Fynúmero	SEQ ID NO.	Especificidad de ELISA				
		Reactividad cruzada con cyFGFR3c	Reactividad cruzada con muFGFR3c	Unión al dominio D1 de huFGFR3	Unión al dominio D2 de huFGFR3	Unión a los dominios D1-D2 de huFGFR3
FF40L54A5	22	+++	+++	-	-	+++

REFERENCIAS

- Turner, N. y R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(2): págs. 116-29.
- Kalff, A. y A. Spencer, *The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies*. *Blood Cancer J*, 2012. **2**: pág. e89.
- Pollett, J.B., et al., *Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance*. *Blood*, 2002. **100**(10): págs. 3819-21.
- Fonseca, R., et al., *Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma*. *Blood*, 2003. **101**(11): págs. 4569-75.
- Agazie, Y.M., et al., *The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3*. *Oncogene*, 2003. **22**(44): págs. 6909-18.
- Ronchetti, D., et al., *Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations*. *Oncogene*, 2001. **20**(27): págs. 3553-62.
- Chesi, M., et al., *Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma*. *Blood*, 2001. **97**(3): págs. 729-36.
- Plowright, E.E., et al., *Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis*. *Blood*, 2000. **95**(3): págs. 992-8.
- Chen, J., et al., *Constitutively activated FGFR3 mutants signal through PLCgamma-dependent and -independent pathways for hematopoietic transformation*. *Blood*, 2005. **106**(1): págs. 328-37.

10. Li, Z., et al., *The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. Blood*, 2001. **97**(8): págs. 2413-9.
- 5 11. Trudel, S., et al., *Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. Blood*, 2004. **103**(9): págs. 3521-8.
12. Trudel, S., et al., *CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. Blood*, 2005. **105**(7): págs. 2941-8.
- 10 13. Chen, J., et al., *FGFR3 as a therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. Oncogene*, 2005. **24**(56): págs. 8259-67.
14. Paterson, J.L., et al., *Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. Br J Haematol*, 2004. **124**(5): págs. 595-603.
- 15 15. Grand, E.K., et al., *Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074. Leukemia*, 2004. **18**(5): págs. 962-6.
16. Gomez-Roman, J.J., et al., *Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Parte 1): págs. 459-65.
- 20 17. Tomlinson, D.C., et al., *FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. J Pathol*, 2007. **213**(1): págs. 91-8.
18. van Rhijn, B.W., et al., *Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. J Pathol*, 2002. **198**(2): págs. 245-51.
- 25 19. Tomlinson, D.C., C.D. Hurst y M.A. Knowles, *Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer. Oncogene*, 2007. **26**(40): págs. 5889-99.
- 30 20. Martinez-Torrecuadrada, J., et al., *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*, 2005. **11**(17): págs. 6280-90.
- 35 21. Martinez-Torrecuadrada, J.L., et al., *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*, 2008. **7**(4): págs. 862-73.
- 40 22. Rauchenberger, R., et al., *Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. J Biol Chem*, 2003. **278**(40): págs. 38194-205.
23. Brack, S., et al., *A bispecific HER2-targeting FynomAb with superior antitumor activity and novel mode of action. Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(8): págs. 2030-9.
- 45 24. Silacci, M., et al., *Discovery and characterization of COVA322, a clinical-stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. MAbs*, 2016. **8**(1): págs. 141-9.
25. Schlatter, D., et al., *Generation, characterization and structural data of chymase binding proteins based on the human Fyn kinase SH3 domain. MAbs*, 2012. **4**(4): págs. 497-508.
- 50 26. Grabulovski, D., M. Kaspar y D. Neri, *A novel, non-immunogenic Fyn SH3-derived binding protein with tumor vascular targeting properties. J Biol Chem*, 2007. **282**(5): págs. 3196-204.
27. Bertschinger, J., D. Grabulovski y D. Neri, *Selection of single domain binding proteins by covalent DNA display. Protein Eng Des Sel*, 2007. **20**(2): págs. 57-68.
- 55

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Covagen AG

5 <120> Moléculas de unión a FGFR3

<130> COV5008EP

<160> 22

10 <170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 64

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Fynómeros anti-FGFR3 de secuencia de consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> 32

<223> cualquier aminoácido

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> 33

<223> cualquier aminoácido

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> 34

<223> cualquier aminoácido

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> 35

<223> cualquier aminoácido

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> 45

<223> cualquier aminoácido

45 <220>

<221> VARIANTE

<222> 51

<223> cualquier aminoácido

50 <400> 1

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro

1 5 10 15

Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Xaa

55 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Xaa Thr Gly Glu

35 40 45

Thr Gly Xaa Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln

50 55 60

60 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Secuencia del bucle RT

<400> 2
 Glu Val Tyr Gly Pro Thr Pro Met
 5 1 5

<210> 3
 <211> 64
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> FF2L4C3

15 <400> 3
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn
 20 20 25 30
 Ser Ser Glu Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

25

<210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> FF44L65G12

35 <400> 4
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg
 20 25 30
 Gly Gly Gln Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

45

<210> 5
 <211> 64
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> FF44L65G7

55 <400> 5
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg
 20 25 30
 Gly Gly Asp Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

65

<210> 6
 <211> 64
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> FF48L66G7

 10 <400> 6
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys
 20 25 30
 15 Gly Gly Ser Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 20

 <210> 7
 <211> 64
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> FF43L65D5

 30 <400> 7
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg
 20 25 30
 35 Lys Gly Lys Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Ala Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 40

 <210> 8
 <211> 64
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> FF44L65B7

 50 <400> 8
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Tyr Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Met Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Arg
 20 25 30
 55 Arg Gly Ser Gly Pro Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Leu Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

 60

 <210> 9
 <211> 357
 <212> PRT
 65 <213> Homo sapiens

<220>

<223> FGFR3, isoforma b

5 <400> 9
 Ile Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly
 20 25 30
 10 Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser
 50 55 60
 Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser
 15 65 70 75 80
 His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg
 85 90 95
 Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 100 105 110
 20 Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
 115 120 125
 Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
 130 135 140
 Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
 145 150 155 160
 25 Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
 165 170 175
 Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
 180 185 190
 30 Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
 210 215 220
 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
 225 230 235 240
 35 Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
 245 250 255
 Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu
 260 265 270
 40 Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val
 275 280 285
 Leu Lys Ser Trp Ile Ser Glu Ser Val Glu Ala Asp Val Arg Leu Arg
 290 295 300
 Leu Ala Asn Val Ser Glu Arg Asp Gly Gly Glu Tyr Leu Cys Arg Ala
 305 310 315 320
 45 Thr Asn Phe Ile Gly Val Ala Glu Lys Ala Phe Trp Leu Ser Val His
 325 330 335
 Gly Pro Arg Ala Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly
 340 345 350
 50 Ser Val Tyr Ala Gly
 355

<210> 10

<211> 355

55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> FGFR3, isoforma c

60 <400> 10
 Ile Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly
 20 25 30
 65

Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser
50 55 60
5 Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser
65 70 75 80
His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg
85 90 95
Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
10 100 105 110
Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
115 120 125
Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
130 135 140
15 Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
145 150 155 160
Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
165 170 175
Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
20 180 185 190
Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
195 200 205
Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
210 215 220
25 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
225 230 235 240
Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
245 250 255
Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu
30 260 265 270
Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val
275 280 285
Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu
290 295 300
35 Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu
305 310 315 320
Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val
325 330 335
Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val
40 340 345 350
Tyr Ala Gly
355

45 <210> 11
<211> 63
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <220>
<223> Dominio SH3 de la cinasa Fyn

<400> 11
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Thr Glu
1 5 10 15
55 Asp Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
20 25 30
Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
60 50 55 60

<210> 12
<211> 586
<212> PRT
65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> huFGFR3b-Fc

5 <400> 12
 Ile Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly
 20 25 30
 10 Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly Pro
 35 40 45
 Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser
 50 55 60
 Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser
 15 65 70 75 80
 His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg
 85 90 95
 Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 100 105 110
 20 Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
 115 120 125
 Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
 130 135 140
 Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
 25 145 150 155 160
 Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
 165 170 175
 Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
 180 185 190
 30 Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
 195 200 205
 Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
 210 215 220
 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
 35 225 230 235 240
 Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
 245 250 255
 Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu
 260 265 270
 40 Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val
 275 280 285
 Leu Lys Ser Trp Ile Ser Glu Ser Val Glu Ala Asp Val Arg Leu Arg
 290 295 300
 Leu Ala Asn Val Ser Glu Arg Asp Gly Gly Glu Tyr Leu Cys Arg Ala
 45 305 310 315 320
 Thr Asn Phe Ile Gly Val Ala Glu Lys Ala Phe Trp Leu Ser Val His
 325 330 335
 Gly Pro Arg Ala Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly
 340 345 350
 50 Ser Val Tyr Ala Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 355 360 365
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 370 375 380
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 55 385 390 395 400
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 405 410 415
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 420 425 430
 60 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 435 440 445
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 450 455 460
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 65 465 470 475 480

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
485 490 495
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
500 505 510
5 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
515 520 525
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
530 535 540
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
10 545 550 555 560
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
565 570 575
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585
15
<210> 13
<211> 584
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> huFGFR3c-Fc
25
<400> 13
Ile Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala
1 5 10 15
Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly
20 25 30
Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly Gly Pro
30 35 40 45
Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser
50 55 60
Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser
65 70 75 80
35 His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg
85 90 95
Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
100 105 110
Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
40 115 120 125
Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
130 135 140
Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
145 150 155 160
45 Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
165 170 175
Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
180 185 190
Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
50 195 200 205
Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
210 215 220
Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
225 230 235 240
55 Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
245 250 255
Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu
260 265 270
Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val
60 275 280 285
Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu
290 295 300
Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu
305 310 315 320
65 Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val

325 330 335
 Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val
 340 345 350
 Tyr Ala Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 5 355 360 365
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 370 375 380
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 385 390 395 400
 10 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 405 410 415
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 420 425 430
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 15 435 440 445
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 450 455 460
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 465 470 475 480
 20 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 485 490 495
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 500 505 510
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 25 515 520 525
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 530 535 540
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 545 550 555 560
 30 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 565 570 575
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580
 35 <210> 14
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cyFGFR3c-Fc
 <400> 14
 Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Val Ala Glu
 45 1 5 10 15
 Val Ser Gly Pro Glu Pro Ser Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly Ser
 20 25 30
 Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Gly Gly Gly Pro Met
 35 40 45
 50 Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Ala Gly Leu Val Pro Ser Glu
 50 55 60
 Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser His
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Leu Val
 55 85 90 95
 Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly Asp
 100 105 110
 Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly
 115 120 125
 60 Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala
 130 135 140
 Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn
 145 150 155 160
 Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Arg Gly
 65 165 170 175

Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu
 180 185 190
 Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val
 195 200 205
 5 Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val
 210 215 220
 Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val
 245 250 255
 10 Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val
 260 265 270
 Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu
 275 280 285
 15 Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser
 290 295 300
 Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
 305 310 315 320
 Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu
 325 330 335
 20 Pro Ala Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr
 340 345 350
 Ala Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 355 360 365
 25 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 370 375 380
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 385 390 395 400
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 405 410 415
 30 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 420 425 430
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 435 440 445
 35 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 450 455 460
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 465 470 475 480
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 485 490 495
 40 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 500 505 510
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 515 520 525
 45 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 530 535 540
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 545 550 555 560
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 565 570 575
 50 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580
 <210> 15
 55 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> muFGFR3c-His
 <400> 15
 Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Ser Gln Gln Glu Gln Val Ala
 1 5 10 15
 65 Phe Gly Ser Gly Asp Thr Val Glu Leu Ser Cys His Pro Pro Gly Gly

20 25 30
 Ala Pro Thr Gly Pro Thr Val Trp Ala Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser His Arg Ile Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn
 5 50 55 60
 Ala Ser His Glu Asp Ala Gly Val Tyr Ser Cys Gln His Arg Leu Thr
 65 70 75 80
 Arg Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser
 85 90 95
 10 Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Val Ala Glu Asp Thr Gly Ala
 100 105 110
 Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val
 115 120 125
 Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro
 15 130 135 140
 Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Arg Gly Glu
 145 150 155 160
 His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val
 165 170 175
 20 Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val
 180 185 190
 Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu
 195 200 205
 Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn
 25 210 215 220
 Gln Thr Ala Ile Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr
 225 230 235 240
 Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn
 245 250 255
 30 Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys
 260 265 270
 Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu
 275 280 285
 His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly
 35 290 295 300
 Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro
 305 310 315 320
 Ala Glu Glu Glu Leu Met Glu Thr Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala
 325 330 335
 40 Gly His His His His His His His His His
 340 345

 <210> 16
 <211> 361
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> huD1-Fc
 50
 <400> 16
 Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly Ser
 55 20 25 30
 Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Gly Gly Gly Pro Met
 35 40 45
 Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser Glu
 50 55 60
 60 Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser His
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg Val
 85 90 95
 Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly Asp
 65 100 105 110

Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly
 115 120 125
 Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 130 135 140
 5 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 165 170 175
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 180 185 190
 10 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 195 200 205
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 210 215 220
 15 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 225 230 235 240
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 245 250 255
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 260 265 270
 20 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 275 280 285
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 290 295 300
 25 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 305 310 315 320
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 325 330 335
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 340 345 350
 30 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360

 <210> 17
 35 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> huD2-Fc

 <400> 17
 Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 45 Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly
 35 40 45
 Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu
 50 55 60
 Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val
 65 70 75 80
 Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val
 85 90 95
 55 Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 115 120 125
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 130 135 140
 60 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 145 150 155 160
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 165 170 175
 65 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

180 185 190
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 195 200 205
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 5 210 215 220
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 225 230 235 240
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 245 250 255
 10 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 260 265 270
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 15 290 295 300
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 305 310 315 320
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 325 330 335
 20 Ser Pro Gly Lys
 340

 <210> 18
 <211> 468
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> huD1-D2-Fc
 30
 <400> 18
 Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val Gly Arg Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln Leu Val Phe Gly Ser
 35 20 25 30
 Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Gly Gly Gly Pro Met
 35 40 45
 Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val Pro Ser Glu
 50 55 60
 40 Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn Ala Ser His
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Gln Arg Val
 85 90 95
 Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly Asp
 45 100 105 110
 Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr Gly
 115 120 125
 Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala
 130 135 140
 50 Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn
 145 150 155 160
 Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg Gly
 165 170 175
 Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu
 55 180 185 190
 Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val
 195 200 205
 Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val
 210 215 220
 60 Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300
5 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
10 340 345 350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380
15 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
20 420 425 430
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460
25 Ser Pro Gly Lys
465
<210> 19
<211> 64
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Fynómeros anti-FGFR3 de secuencia de consenso
35 <220>
<221> VARIANTE
<222> 51
<223> cualquier aminoácido
40 <400> 19
Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Met Ser Thr
1 5 10 15
Thr Ala Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
45 20 25 30
Ser Pro His Gly Gln Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45
Thr Gly Xaa Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 50 55 60
50
<210> 20
<211> 7
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle RT
60 <400> 20
Glu Val Met Ser Thr Thr Ala
1 5
65 <210> 21

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

 5 <220>
 <223> Secuencia del bucle src

 <400> 21
 Ser Gln Ser Pro His
 10 1 5

 <210> 22
 <211> 64
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> FF40L54A5

 20 <400> 22
 Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Val Met Ser Thr
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Gln
 20 25 30
 25 Ser Pro His Gly Gln Tyr Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45
 Thr Gly Trp Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que se une a las isoformas 3b y 3c del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3b y FGFR3c), en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que

(a) GVTLFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQIL(X¹)(X²)(X³)(X⁴)GPYWEA
RSL(X⁵)TGETG(X⁶)IPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1);

en la que las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶) pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos;

y

(b) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos de (a), en la que la determinación de identidad excluye las posiciones de aminoácidos (X¹) a (X⁶) y a condición de que la secuencia de aminoácidos EVYGPTPM (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de aminoácidos 12 a 19 de la SEQ ID NO: 1 esté conservada y los aminoácidos P e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 1 estén conservados;

(c) GVTLFVALYDYEVMSSTALSFSHKGEKFQILSQSPHGQYWEARSLTTGETG(X⁶)IPSNY
VAPVDSIQ (SEQ ID NO: 19),

en la que la posición del aminoácido (X⁶) puede ser cualquier aminoácido; y

(d) una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos de (c), en la que la determinación de identidad excluye la posición de aminoácido (X⁶) y a condición de que las secuencias de aminoácidos EVMSTTA (SEQ ID NO: 20) en las posiciones de aminoácidos 12 a 18 de la SEQ ID NO: 19 y SQSPH (SEQ ID NO: 21) en las posiciones de aminoácidos 31 a 35 de la SEQ ID NO: 19 estén conservadas y los aminoácidos Q e Y en las posiciones de aminoácidos 37 y 38 de la SEQ ID NO: 19 estén conservados.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que

(X¹) es N, R o K, y es preferentemente R o K;

(X²) es S, G, K o R, y es preferentemente G, K o R;

(X³) es S o G, y es preferentemente G;

(X⁴) es E, Q, D, S o K, y es preferentemente Q, D, S o K;

(X⁵) es T o A; y

(X⁶) es Y, W o L, y es preferentemente L o W.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO 3 a 8 y 22.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 4,

SEQ ID NO: 5,

SEQ ID NO: 6,

SEQ ID NO: 7,

SEQ ID NO: 8 y

SEQ ID NO: 22.

5. Una construcción de fusión que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 fusionada a un compuesto adicional.

6. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el compuesto adicional es un compuesto tóxico.

7. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el compuesto adicional comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio Fc de un anticuerpo, un anticuerpo o una combinación de los mismos.

8. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el anticuerpo se dirige contra una diana seleccionada entre el grupo que consiste en GM-2, CD38, ICAM-1, SLAMF7, CD45, CD40, CD74, IGFR-1, CD20, BAFF, BCMA, CD66, GRP78, CXCR4, EGFR, EPCAM, TROP-2, B7H3 y CEACAM-1.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la construcción de fusión de las reivindicaciones 5 o 7, o una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

- 5 10. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la construcción de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 o cualquier combinación de los mismos.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad mediada por linfocitos T.
- 10 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de testículo y cáncer urotelial.
- 15 13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer se selecciona entre mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células escamosas y cáncer colorrectal.
- 20 14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la enfermedad mediada por linfocitos T se selecciona entre artritis reumatoide (AR), artritis por colágeno II, esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), psoriasis, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Sjogren, enfermedad tiroidea, sarcoidosis, uveítis autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad celíaca y miastenia grave.

Alineación se secuencias múltiples CLUSTAL O(1.2.4)

```

3  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILNSSEGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
7  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILRKGGPYWEARSLATGETGLIPSNYVAPVDSIQ
4  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILRGGQGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
5  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILRGGDGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
6  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILKGGSGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
8  GVTLEFVALYDYEVYGPTPMLSFHKGEKFQILRRGSGPYWEARSLTTGETGLIPSNYVAPVDSIQ
  ***** . . *****; *****

```

FIG. 1

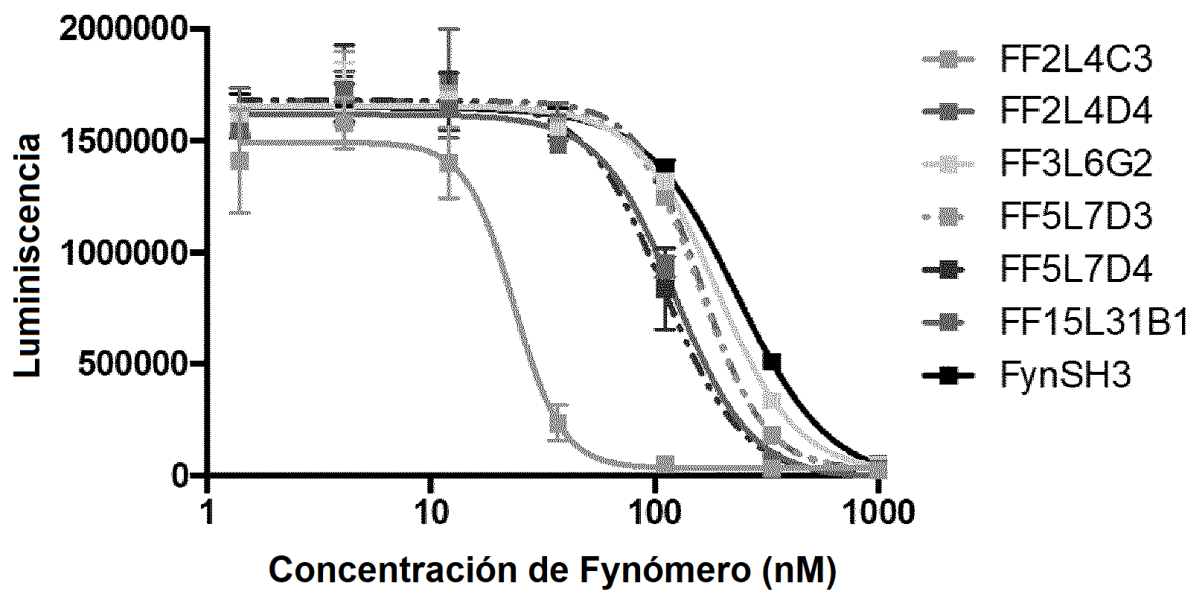


FIG. 2

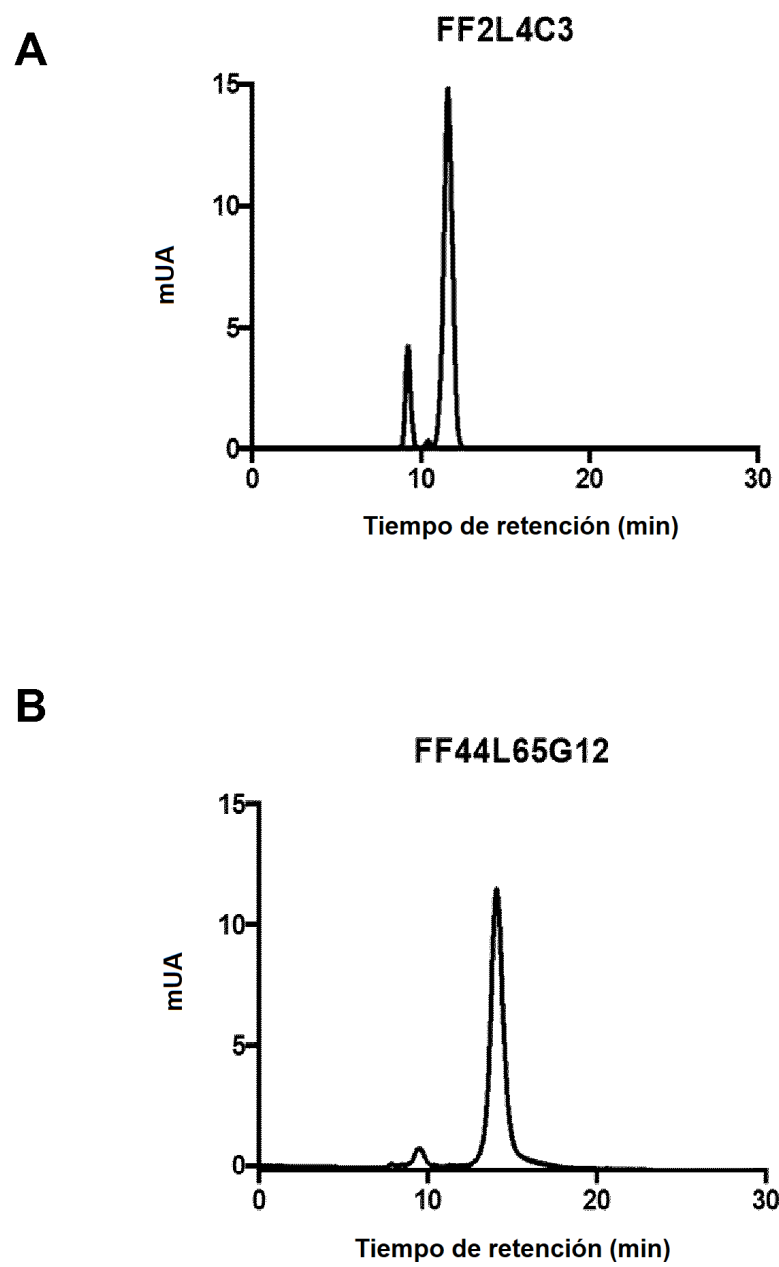


FIG. 3

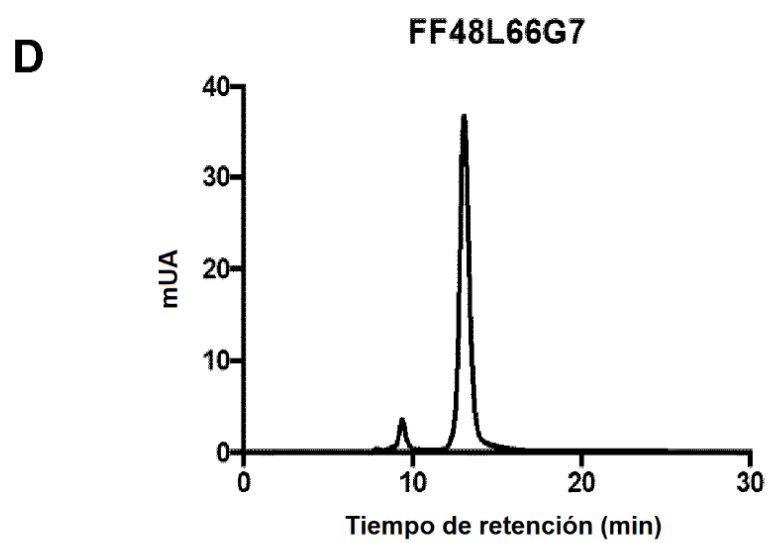
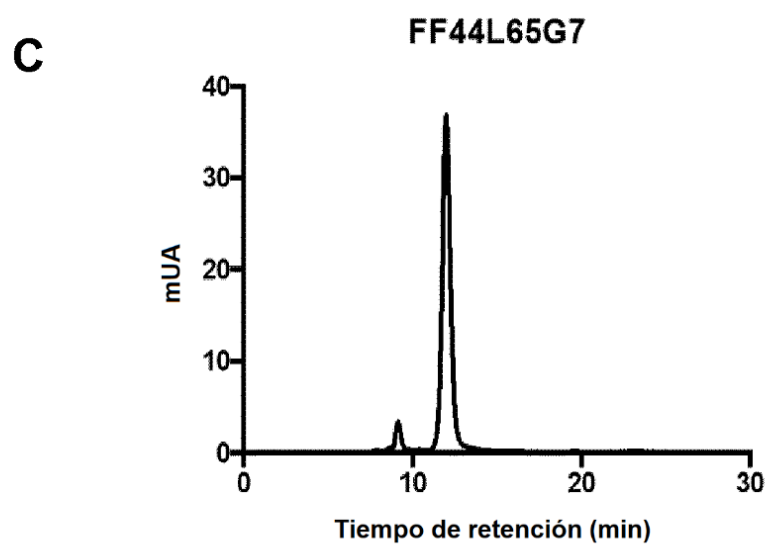


FIG. 3 - continuación

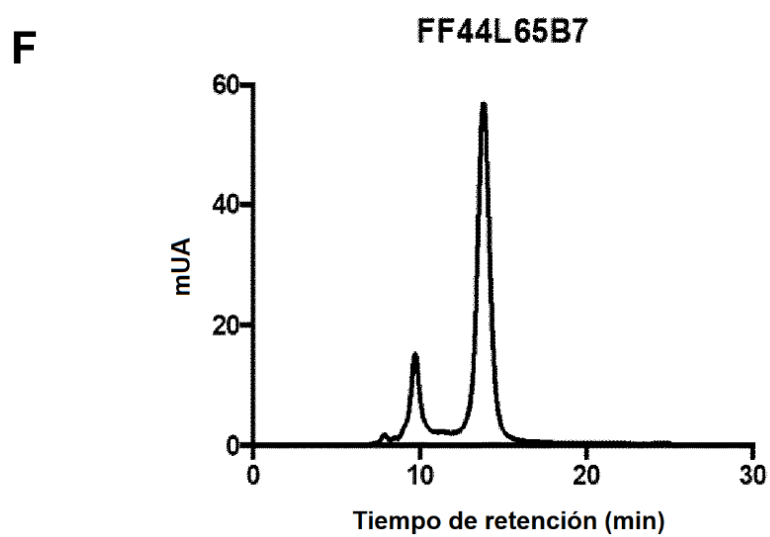
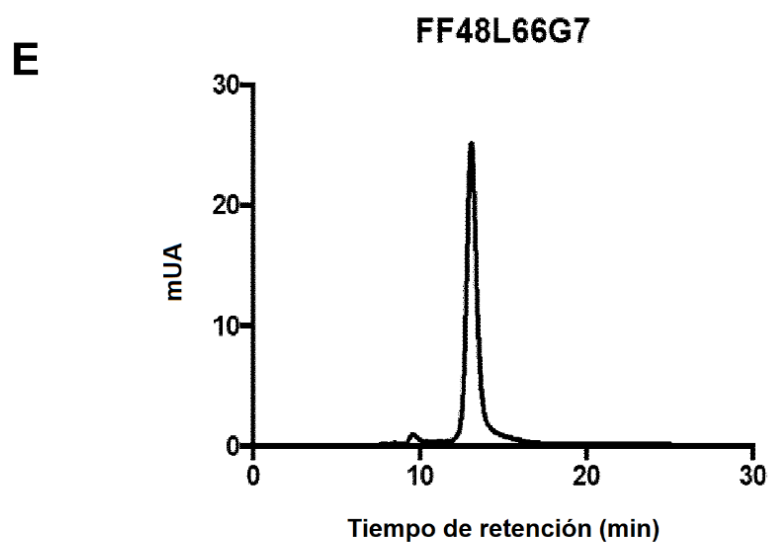
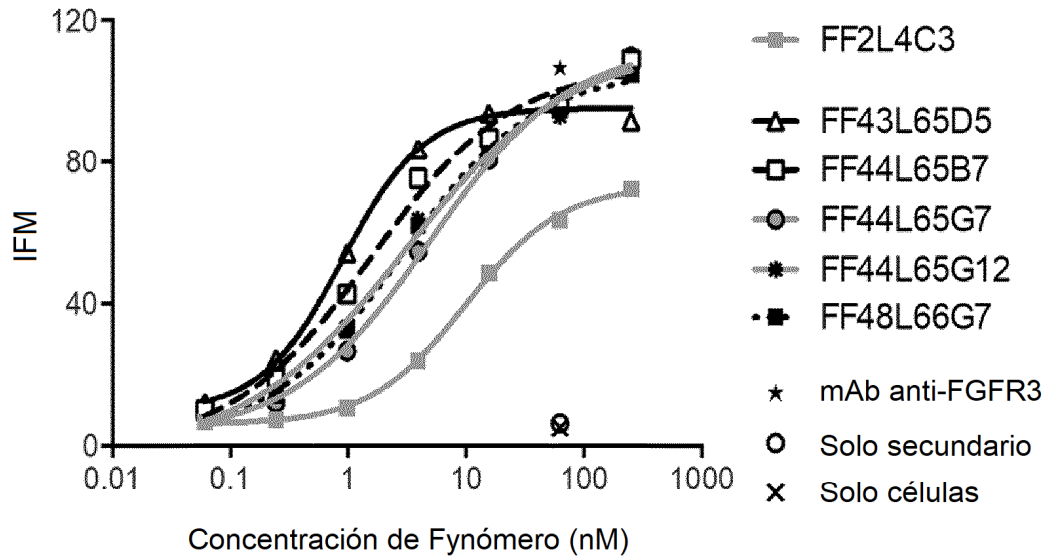


FIG. 3 - continuación

A

Finómeros en células KMS-11



B

Finómeros en células N87

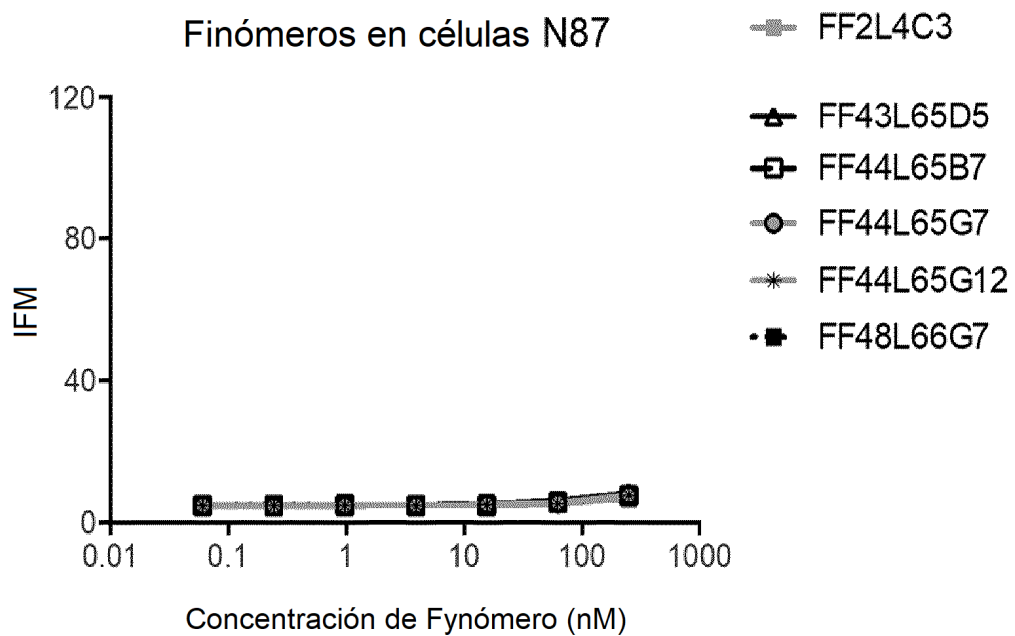
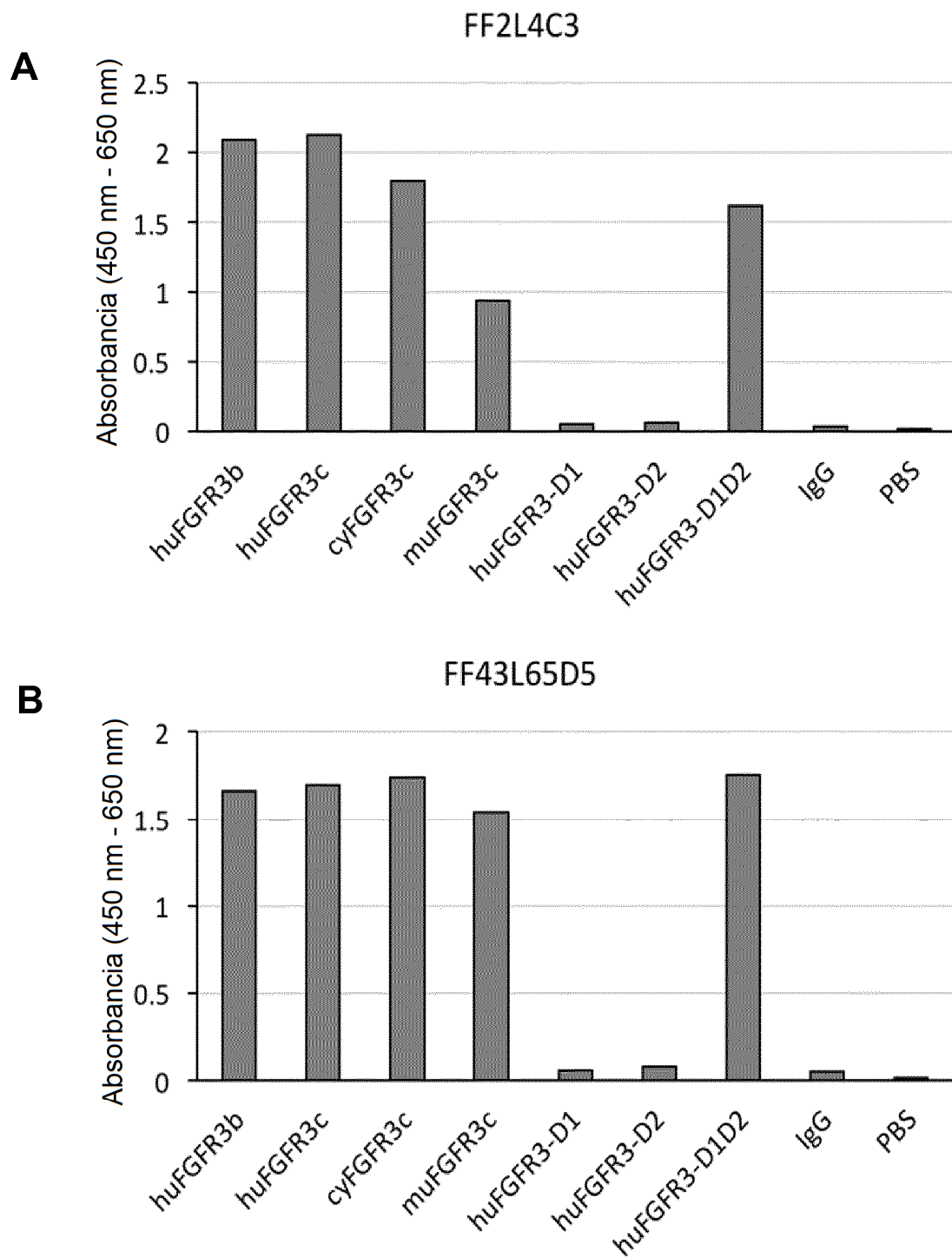
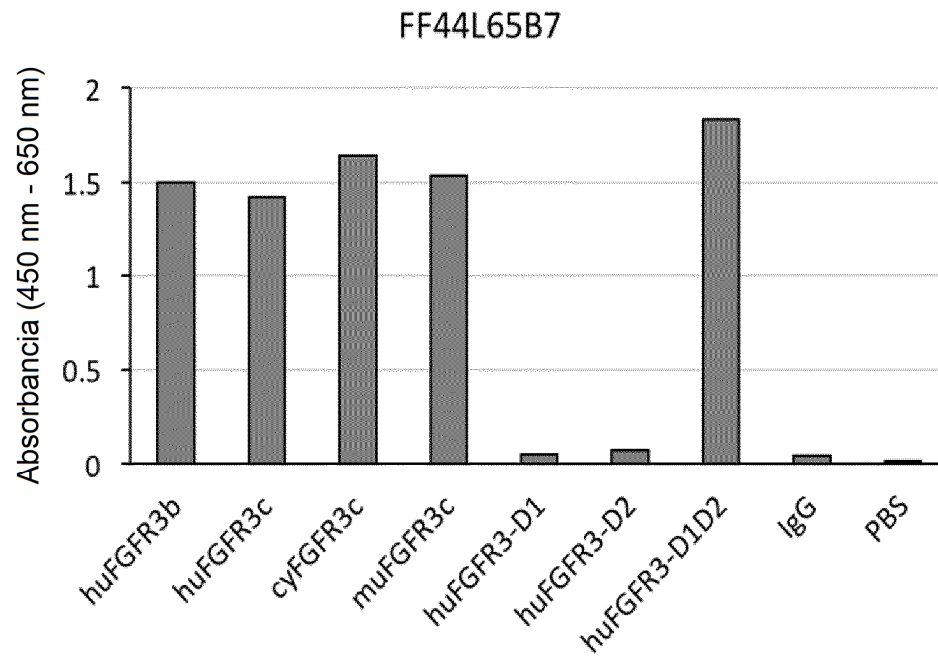


FIG. 4

**FIG. 5**

C



D

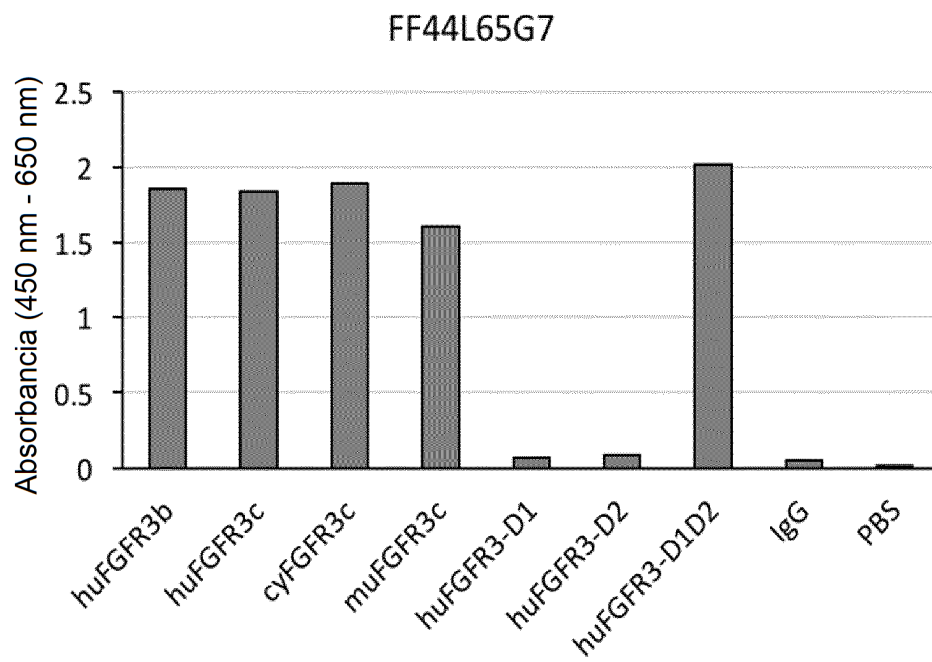
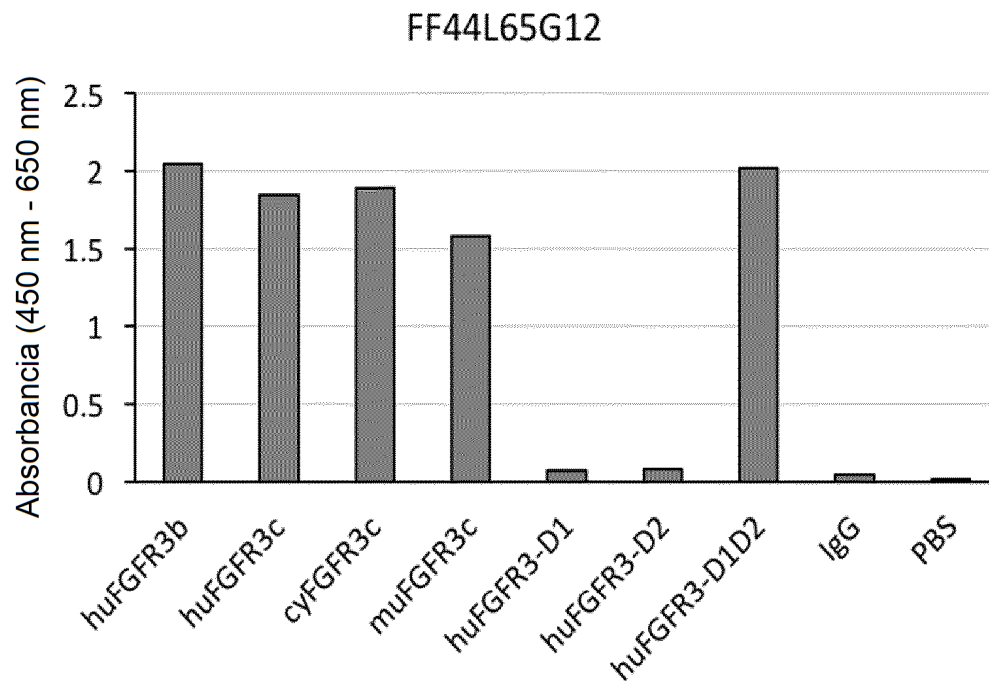


FIG. 5 - continuación

E



F

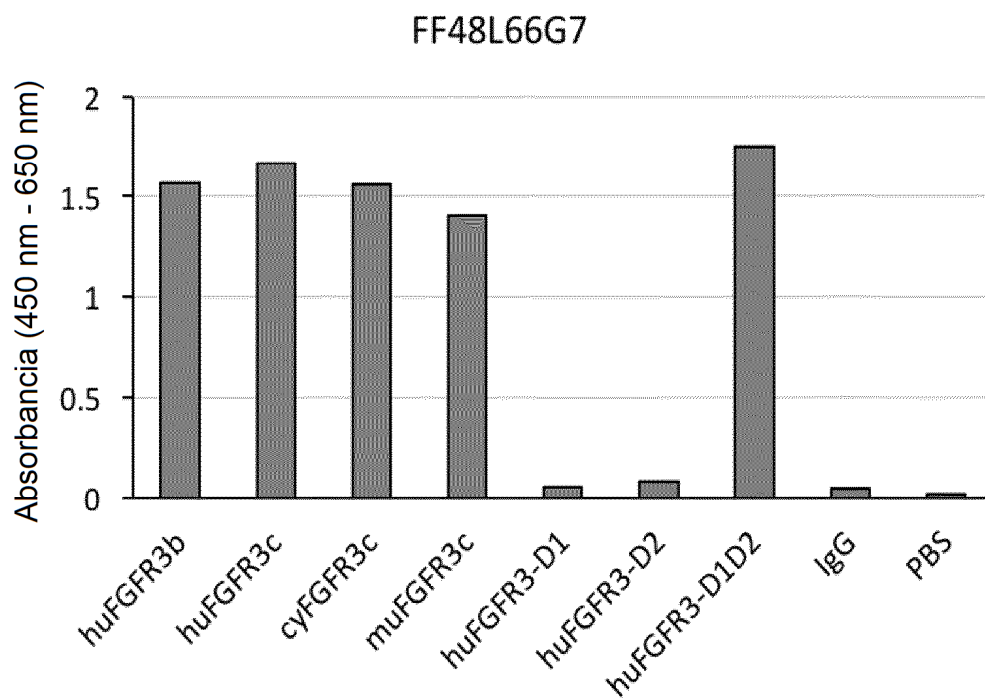


FIG. 5 - continuación

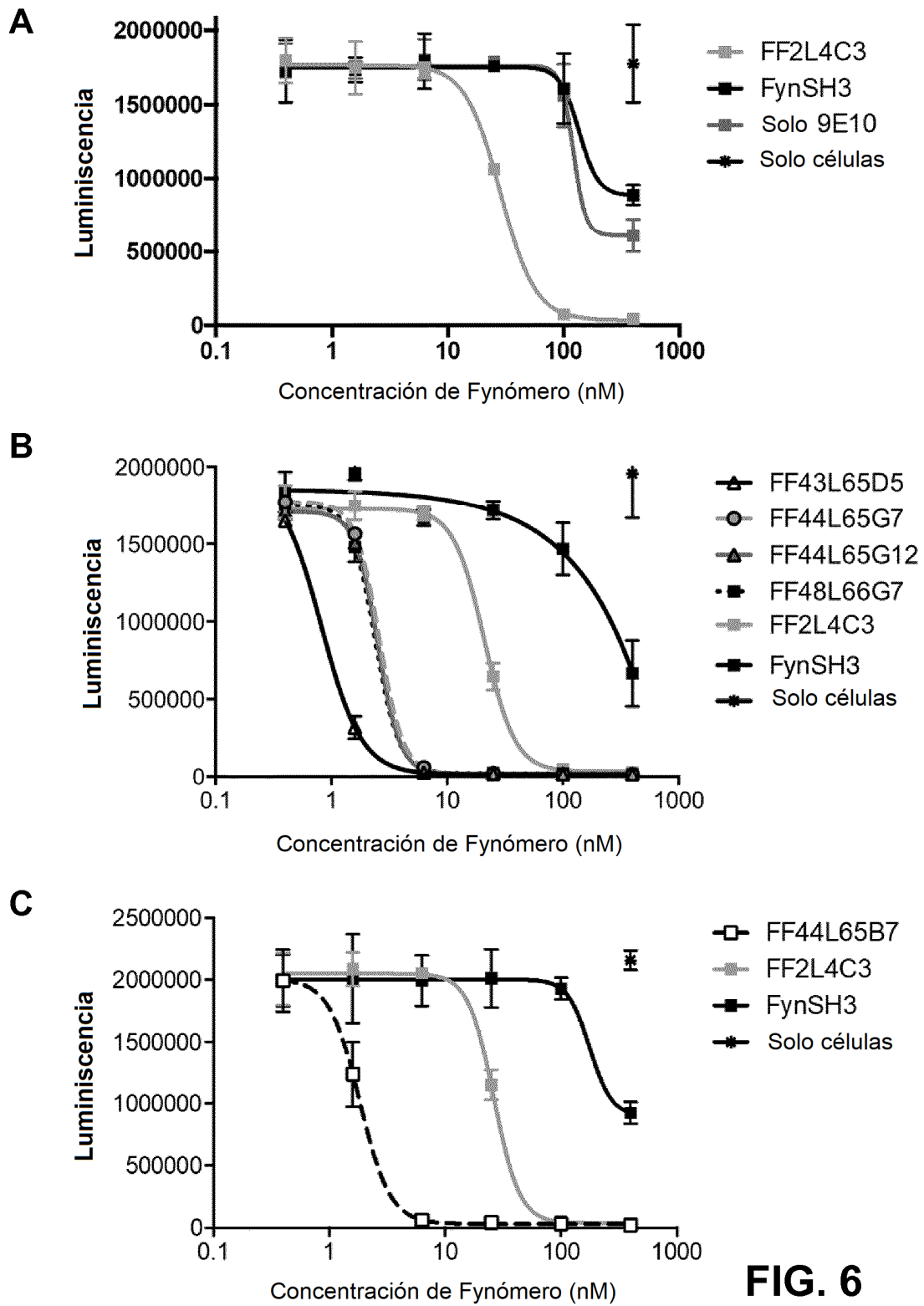


FIG. 6