

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICIT
PATENTE DE

ENTRADA EN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

21. EXPEDIENTE No. _____

ANTICUERPOS ANTI-FGFR3 Y METODOS QUE LOS UTILIZAN

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC. _____

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA _____

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO _____

22. BOGOTÁ, D.C. _____

AS: 117.818

PETITOR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA


No. 11-112595-00000-0000

 Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

ón

Act. 411 PRESENTACIÓN Folios: 324

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL
1 **SOLICITUD DE:**

Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTENombre: **GENENTECH, INC.**Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco,
CA 94080, Estados Unidos de AméricaNacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
AméricaLugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

 En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de
 Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: **ASHKENAZI, Avi; QING, Jing; WIESMANN, Christian; WU, Yan.**
 Dirección: 1456 Tarrytown Street, San Mateo, California 94402, Estados Unidos
 de América; 1543 22nd Avenue, San Francisco California 94122, Estados Unidos
 de América; Fuchshagweg 27, CH-4103 Bottmingen, Suiza; 1160 Blythe Street,
 Foster City, California 94404, Estados Unidos de América; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Suiza, respectivamente.

5 PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2010/028470Fecha 24.03.2010Publicación Internacional No. WO 2010/111367 A1Fecha 30.09.2010**6 Título (54):**ANTICUERPOS ANTI-FGFR3 Y MÉTODOS QUE LOS UTILIZAN**7 Clasificación Internacional (51):****8 Prioridad**

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

25.03.2009

61/163,222

9 Comprobante de pago No. 11-65586, 11-31982, 11-58847, 11-50448, 11-52947 **Fecha** 03-08-2011

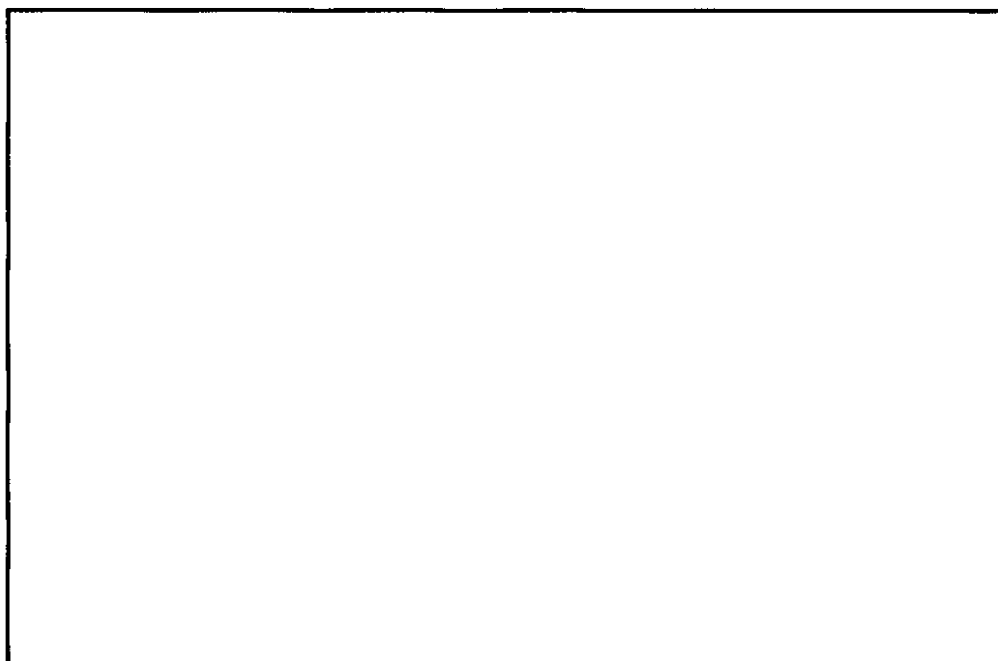
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 783.000 (29*\$27.000).

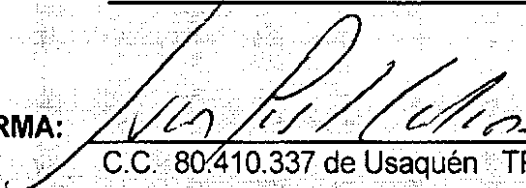
11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:


C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

117818 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0065586

Bogotá D.C., Julio 06 de 2011 - 18:10:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456017273	06/07/2011	29.569.600.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNIDITARIO	VR. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 6 de 2011 - 18:10:38

1178184

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0031982

Bogotá D.C., Abril 06 de 2011 - 12:50:28

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	999999999	31960	06/04/2011		4.507.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	540.000.00	540.000.00
				\$540.000.00

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

117818

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0058847

Bogotá D.C., Junio 17 de 2011 - 16:42:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

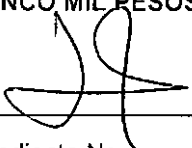
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456015324	17/06/2011	25.888.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 17 de 2011 - 16:42:54

1178106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

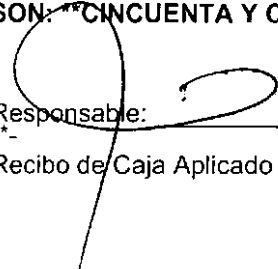
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0050448
		Bogotá D.C., Mayo 26 de 2011 - 07:41:42

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391953564	25/05/2011	25.158.200.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	54.000.00
			\$54.000.00
=====			

SON: CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-112595-00000-0000
Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0052947
		Bogotá D.C., Junio 01 de 2011 - 17:17:55

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391953553	01/06/2011	39.763.600.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	54.000.00
			\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 325

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 326

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 September 2010 (30.09.2010)(10) International Publication Number
WO 2010/111367 A1(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)(74) Agents: COBURN, Cara, M. et al.; Genentech, Inc., 1
DNA Way, MS-49, South San Francisco, California
94080 (US).(21) International Application Number:
PCT/US2010/028470(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:
24 March 2010 (24.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/163,222 25 March 2009 (25.03.2009) US(71) Applicant (for all designated States except US):
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San
Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

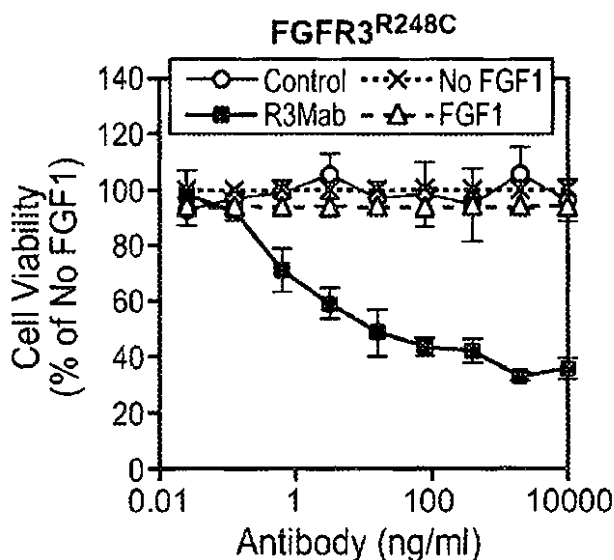
(75) Inventors/Applicants (for US only): ASHKENAZI, Avi
[US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, California
94402 (US). QING, Jing [US/US]; 1543 22nd Avenue,
San Francisco, California 94122 (US). WIESMANN,
Christian [DE/CH]; Fuchshagweg 27, CH-4103 Bottm-
ingen (CH). WU, Yan [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster
City, California 94404 (US).(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-FGFR3 ANTIBODIES AND METHODS USING SAME

**FIG. 9D**(57) Abstract: The invention provides FGFR3 antibod-
ies, and compositions comprising and methods of using
these antibodies.

WO 2010/111367 A1

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))* — *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
30 de septiembre de 2010 (30.09.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/0111367 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2010/028470

(22) Fecha de Presentación Internacional:
24 de marzo de 2010 (24.03.2010)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
61/163,222 25 de marzo de 2009 (25.03.2009) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): ASHKENAZI, Avi [US/US]; 1456 Tarrytown Street, San Mateo, California 94402 (US). QING, Jing [US/US]; 1543 22nd Avenue, San Francisco California 94122 (US). WIESMANN, Christian [DE/CH]; Fuchshagweg 27, CH-4103 Bottmingen (CH). WU, Yan [US/US]; 1160 Blythe Street, Foster City, California 94404 (US).
- (74) Agente: COBURN, Cara, M. et al; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (US)

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(Continúa en la siguiente página)

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-FGFR3 Y MÉTODOS QUE LOS UTILIZAN

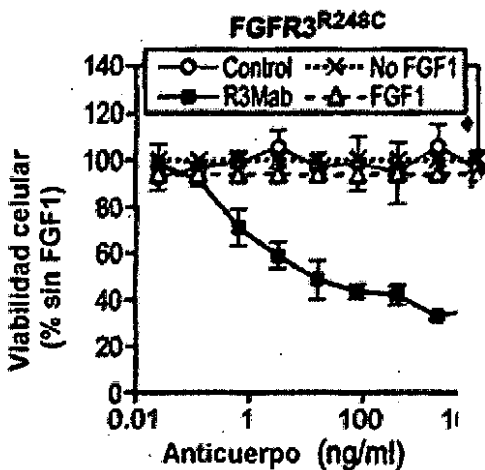


FIG. 9D

(57) Resumen: La invención presenta anticuerpos de FGFR3 y composiciones que los comprenden y métodos para usar estos anticuerpos.



-
- *antes del vencimiento de la fecha límite para modificar las reivindicaciones y ser publicado nuevamente en el evento de recibir modificaciones(Regla 48.2(h))*
 - *con un listado de secuencias parte de la descripción (Regla 5.2(a))*

ANTICUERPOS ANTI-FGFR3 Y MÉTOSOS QUE LOS UTILIZAN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patentes de los Estados Unidos Número 61/163.222, presentada el 25 de marzo de 2009, el contenido de la cual se incorpora a la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona, en general, con el campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-FGFR3, y a los usos de estos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y sus receptores (FGFRs) desempeñan roles cruciales durante el desarrollo embrionario, la homeostasis de los tejidos y el metabolismo (1–3). En los humanos, hay 22 FGFs (FGF1–14, FGF16–23) y cuatro receptores FGF con dominio de tirosina quinasa (FGFR1–4). Los FGFRs consisten en una región extracelular de unión al ligando, con dos o tres dominios de tipo inmunoglobulina (IgD1–3), una única región transmembrana de una sola vía y un dominio citoplásmico dividido de tirosina quinasa. Cada uno de FGFR1, 2 y 3 consta de dos isoformas de empalme alternativo, designadas IIIb y IIIc. Estas isoformas difieren en aproximadamente 50 aminoácidos en la segunda mitad del IgD3, y tienen distribución diferenciada en los tejidos y especificidad de ligandos. En general, la isoforma IIIb se encuentra en las células epiteliales, en tanto que la IIIc se expresa en las células mesenquimales. Al unirse a FGF en concierto con los proteoglicanos de heparan sulfato, los FGFRs se dimerizan y se fosforilan en residuos específicos de tirosina. Esto facilita el reclutamiento de proteínas adaptadoras críticas, tales como el sustrato de FGFR 2 α (FRS2 α), que lleva a la activación de múltiples cascadas de señalización, incluyendo la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y vías de PI3K–AKT (1, 3, 4). En consecuencia, los FGFs y sus receptores afines regulan una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia, de manera dependiente del contexto.

Los FGFRs activados de manera aberrante han estado implicados en malignidades humanas específicas (1, 5). En particular, la traslocación cromosómica t(4;14) (p16.3;q32) se produce en aproximadamente 15–20% de los pacientes con mieloma múltiple, llevando a la sobreexpresión del FGFR3 y se

correlaciona con una sobrevida total más corta (6–9). El FGFR3 está implicado asimismo en el otorgamiento de quimiorresistencia a las líneas de células de mieloma en cultivo (10), consistente con la pobre respuesta clínica de los pacientes con t(4;14)+ a la quimioterapia convencional (8). La sobreexpresión del FGFR3 activado por mutación es suficiente para inducir la transformación en células hematopoyéticas y fibroblastos (11–14, 15), modelos de ratones transgénicos (16), y modelos murinos de trasplante de médula ósea (16, 17). En consecuencia, se ha propuesto el FGFR3 como blanco terapéutico potencial en el mieloma múltiple. Por cierto, varios inhibidores de pequeñas moléculas que se dirigen a los FGFRs, aunque no son selectivos para FGFR3 y tienen actividad de inhibición cruzada con ciertas quinasas más, han demostrado citotoxicidad contra las células de mieloma FGFR3–positivas en cultivo y en modelos de ratón (18–22).

También se ha documentado la sobreexpresión de FGFR3 en una elevada fracción de cánceres de vejiga (23, 24). Más aun, se han identificado mutaciones activadoras somáticas en FGFR3 en 60–70% de los carcinomas papilares y 16–20% de los carcinomas músculo invasivos de vejiga (24, 25). En experimentos de cultivo celular, el ARN de interferencia (11, 26) o un fragmento de anticuerpo Fv de cadena simple de FGFR3 inhibió la proliferación de células de cáncer de vejiga (27). Un estudio reciente demostró que un conjugado anticuerpo FGFR3–toxina atenúa el desarrollo de xenoinjerto de una línea celular de cáncer de vejiga mediante la administración de toxinas mediadas por FGFR3 a los tumores (28). Sin embargo, aún no se ha dilucidado si la señalización de FGFR3 es, en efecto, un propulsor oncogénico del crecimiento in vivo de tumores de vejiga. Más aun, no se ha definido el potencial terapéutico de tomar como blanco el FGFR3 en el cáncer vesical basándose en modelos in vivo. Las publicaciones atinentes al FGFR3 y a anticuerpos anti–FGFR3 incluyen la Publicación de patente de los Estados Unidos No. 2005/0147612; Rauchenberger et al, J Biol Chem 278 (40):38194–38205 (2003); WO2006/048877; Martínez–Torrecuadrada et al, (2008) Mol Cancer Ther 7(4): 862–873; WO2007/144893; Trudel et al. (2006) 107(10): 4039–4046; Martínez–Torrecuadrada et al (2005) Clin Cancer Res 11 (17): 6280–6290; Gomez–Roman et al (2005) Clin Cancer Res 11:459–465; Drenzo, R et al (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, Extracto No. 2080; WO2010/002862.

Está claro que subsiste la necesidad de agentes con atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo de agentes terapéuticos. La invención descrita en la presente satisface esta necesidad y ofrece otros beneficios.

Todas las referencias aquí citadas, incluyendo solicitudes y publicaciones de patentes, se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La invención se basa, en parte, en la identificación de una variedad de agentes que se unen al FGFR3 (tales como anticuerpos y fragmentos de los mismos). El FGFR3 presenta un importante y ventajoso blanco terapéutico y la invención presenta composiciones y métodos basados en la unión de los agentes al FGFR3. Los agentes de unión a FGFR3 de la invención, descritos en este documento, constituyen importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para usar en la aplicación a condiciones patológicas asociadas con la expresión y/o actividad de las vías de señalización de FGFR3. En consecuencia, la invención presenta métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión a FGFR3.

En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer anticuerpos que se unen a FGFR3. En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a un FGFR3. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a la isoforma IIIb de FGFR3 y/o a la isoforma IIIc de FGFR3. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un FGFR3 mutado (por ej., una o más de las IIIb de FGFR3 R248C, S249C, G372C, Y375C, K652E, y/o una o más de las IIIc de FGFR3 R248C, S249C, G370C, Y373C, K650E). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une un FGFR3 monomérico (por ej., las isoformas IIIb y/o IIIc monoméricas de FGFR3). En algunas realizaciones, el anticuerpo promueve la formación de FGFR3 monomérico, por ejemplo mediante la estabilización de la forma monomérica de FGFR3 con respecto a la forma dimérica de FGFR3.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 aislado, donde una forma de IgG de longitud total del anticuerpo se une al FGFR3 humano con una K_d de 1×10^{-7} o más fuerte. Como ha quedado bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor se puede determinar empleando cualquiera de una variedad de ensayos y se la expresa en términos de una variedad de valores cuantitativos. En consecuencia, en una realización, la afinidad de unión se expresa en términos de valores K_d y refleja la afinidad de unión intrínseca (por ej., con efectos de avidéz minimizados). En general y preferentemente, se mide la afinidad de unión in vitro, ya sea en un entorno sin células o asociado a las células. Se puede utilizar cualquiera de un número de ensayos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente, para obtener mediciones de la afinidad de unión, incluyendo, por ejemplo, Biacore,

radioinmunoensayo (RIA) y ELISA. En algunas realizaciones, la forma de IgG de longitud total del anticuerpo se une al FGFR3 humano con una K_d de 1×10^{-8} o más fuerte, con una K_d de 1×10^{-9} o mayor, o con una K_d de 1×10^{-10} o mayor.

En general, los anticuerpos anti-FGFR3 de la presente invención son anticuerpos antagonistas. Por consiguiente, en un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben la actividad de FGFR3 (por ej., la actividad de FGFR3-IIIb y/o FGFR3-IIIc). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 (por lo general en forma bivalente) no posee una función agonista de FGFR3 sustancial. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-FGFR3 (por lo general en forma bivalente) posee poca o ninguna función agonista de FGFR3. En una realización, un anticuerpo de la invención (generalmente en forma bivalente) no exhibe un nivel de actividad agonista de FGFR3 superior a un nivel de fondo que sea de importancia estadística.

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

En un aspecto, la invención presenta anticuerpos anti-FGFR3 que no poseen actividad apoptótica de consideración (por ej., no induce la apoptosis de una célula, por ej., una célula de carcinoma de células de transición o una célula de mieloma múltiple, como por ejemplo una célula de mieloma múltiple que comprende una traslocación del FGFR3 tal como una traslocación t(4;14) translocation). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 posee poca o ninguna función apoptótica. En alguna realización, los anticuerpos de FGFR3 no exhiben ninguna función apoptótica que supere un nivel de fondo que sea de importancia estadística.

En un aspecto, la invención presenta anticuerpos anti-FGFR3 que no inducen sustancial regulación a menos del FGFR3. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 induce poca o ninguna regulación a menos. En alguna realización, los anticuerpos de FGFR3 no inducen regulación a menos del receptor que esté por encima de un nivel de fondo que sea de importancia estadística.

En un aspecto, la invención presenta anticuerpos anti-FGFR3 que poseen función efectora. En una realización, la función efectora comprende citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En una realización, el anticuerpo anti-FGFR3 (en algunas realizaciones un anticuerpo anti-FGFR3 desnudo) tiene la capacidad de matar una célula, en algunas realizaciones, células de mieloma

múltiple (por ej., células de mieloma múltiple que comprenden una traslocación, por ej., una traslocación t(4;14)). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 tiene la capacidad de matar una célula que expresa aproximadamente 10.000 moléculas de FGFR3 por célula o más (como por ejemplo aproximadamente 11.000, aproximadamente 12.000, aproximadamente 13.000, aproximadamente 14.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 16.000, aproximadamente 17.000, aproximadamente 18.000 o más moléculas de FGFR3 por célula). En otras realizaciones, la célula expresa aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, o más moléculas de FGFR3 por célula.

En un aspecto, el anticuerpo anti-FGFR3 de la invención inhibe la actividad constitutiva de FGFR3. En algunas realizaciones, la actividad constitutiva de FGFR3 es una actividad constitutiva de FGFR3 dependiente del ligando. En algunas realizaciones, actividad constitutiva de FGFR3 es una actividad constitutiva de FGFR3 independiente de ligandos.

En un aspecto, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe el FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{R248C}. En el presente contexto, se entiende que el término "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{R248C}" abarca FGFR3-IIIb^{R248C} y FGFR3-IIIc^{R248C}, como así también otras formas del FGFR3 que comprenden una mutación de R a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb R248. Una persona con capacitación normal en la técnica sabe cómo alinear secuencias de FGFR3 para identificar los residuos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3, por ej., alinear una secuencia de FGFR3-IIIc con una secuencia de FGFR3-IIIb para identificar la posición en FGFR3 correspondiente a la posición R248 de FGFR3-IIIb. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe el FGFR3-IIIb^{R248C} y/o FGFR3-IIIc^{R248C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben el FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}. Por conveniencia, se entiende el término "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}" abarca FGFR3-IIIb^{K652E} y FGFR3-IIIc^{K650E}, como así también otras formas de FGFR3 que comprenden una mutación de K a E en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb K652. Una persona con capacitación normal en la técnica sabe cómo alinear secuencias de FGFR3 para identificar los residuos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3, por ej., alinear una

secuencia de FGFR3-IIIc con una secuencia de FGFR3-IIIb a fin de identificar la posición en FGFR3 correspondiente a la posición K652 de FGFR3-IIIb. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe FGFR3-IIIb^{K652E} y/o FGFR3-IIIc^{K650E}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben el FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}. Por razones de conveniencia, se entiende que el término "que comprenden una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}" abarca a FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIc^{S249C}, como así también otras formas de FGFR3 que comprenden una mutación de S a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb S249. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe FGFR3-IIIb^{S249C} y/o FGFR3-IIIc^{S249C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}. Por razones de conveniencia, se entiende que el término "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}" abarca FGFR3-IIIb^{G372C} y FGFR3-IIIc^{G370C}, como así también otras formas de FGFR3 que comprenden una mutación de G a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb G372. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe FGFR3-IIIb^{G372C} y/o FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben FGFR3 que comprenden una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}. Por razones de conveniencia, se entiende que el término "que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}" abarca FGFR3-IIIb^{Y375C} and FGFR3-IIIc^{Y373C}, como así también otras formas de FGFR3 que comprenden una mutación de S a C en una posición correspondiente a FGFR3-IIIb S249. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe FGFR3-IIIb^{Y375C} y/o FGFR3-IIIc^{Y373C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIb^{K652E} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIc^{K650E} y (b) uno o más de FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C}, y FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIb^{R248C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIc^{R248C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIb^{G372C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{R248C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben (a) FGFR3-IIIc^{G370C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{R248C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En un aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 inhiben FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C} y FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 aislado que comprende:

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

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia A1-A11, en la cual A1-A11 es RASQDVDTSLA (SEC ID NO: 87),

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la cual B1-B7 es SASFLYS (SEC ID NO: 88),

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la cual C1-C9 es QQSTGHPQT (SEC ID NO: 89),

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la cual D1-D10 es GFTFTSTGIS (SEC ID NO: 84),

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la cual E1-E18 es GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEC ID NO: 85), y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia F1-F20, en la cual F1-F20 es ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEC ID NO: 86); y

(b) por lo menos una HVR variante, donde la secuencia de HVR variante comprende la modificación de por lo menos un residuo (por lo menos dos residuos, por lo menos tres o más residuos) de la secuencia ilustrada en SEC ID NOS: 1-18, 48-131 y 140-145. La modificación es convenientemente una sustitución, inserción o delección.

En algunas realizaciones, una variante HVR-L1 comprende 1-6 (1, 2, 3, 4, 5, o 6) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: A5 (V

o D), A6 (V o I), A7 (D, E o S), A8 (T o I), A9 (A o S) y A10 (V o L). En algunas realizaciones, una variante HVR-L2 comprende 1-2 (1 o 2) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (S o G), B4 (F o S o T) y B6 (A o Y). En algunas realizaciones, una variante HVR-L3 comprende 1-6 (1, 2, 3, 4, 5, o 6) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: C3 (G o S o T), C4 (T o Y o A), C5 (G o S o T o A), C6 (A o H o D o T o N), C7 (Q o P o S) y C8 (S o Y o L o P o Q). En alguna realización, una variante HVR-H1 comprende 1-3 (1, 2, o 3) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (S o T), D5 (W o Y o S o T), D6 (S o G o T). En alguna realización, una variante HVR-H2 comprende 1-6 (1, 2, 3, 4, 5, o 6) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E2 (R o S), E6 (Y o A o L o S o T), E7 (A o Q o D o G o Y o S o N o F), E8 (A o D o G), E9 (T o S), E10 (K o F o T o S), E11 (Y o H o N o I).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 aislado que comprende:

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

(i) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A, en la cual X₁ es V o D, X₂ es V o I, X₃ es D, E o S, X₄ es T o I, X₅ es A o S y X₆ es V o L (SEC ID NO: 146),

(ii) HVR-L2 que comprende la secuencia X₁ASFLX₂S en la cual X₁ es S o G y X₂ es A o Y (SEC ID NO: 147),

(iii) HVR-L3 que comprende la secuencia QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T, en la cual X₁ es G, S o T, X₂ es T, Y o A, X₃ es G, S, T, o A, X₄ es A, H, D, T, o N, X₅ es Q, P o S, X₆ es S, Y, L, P o Q (SEC ID NO: 148),

(iv) HVR-H1 que comprende la secuencia GFX₁FX₂X₃TGIS, en la cual X₁ es S o T, X₂ es W, Y, S o T, X₃ es S, G, o T (SEC ID NO: 149),

(v) HVR-H2 que comprende la secuencia GRIYPX₁X₂X₃X₄X₅X₆YADSVKG, en la cual X₁ es Y, A, L, S, o T, X₂ es A, Q, D, G, Y, S, N o F, X₃ es A, D, o G, X₄ es T o S, X₅ es K, F, T, o S, X₆ es Y, H, N o I (SEC ID NO: 150), y

(vi) HVR-H3 que comprende la secuencia ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEC ID NO: 151).

En algunas realizaciones, HVR-L1 comprende la secuencia RASQX₁VX₂X₃X₄VA, en la cual X₁ es V o D, X₂ es D, E o S, X₃ es T o I, X₄ es A o S (SEC ID NO: 152). En algunas realizaciones, HVR-L3 comprende la secuencia

QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T, en la cual X₁ es S, G, o T, X₂ es Y, T, o A, X₃ es T o G, X₄ es T, H o N, X₅ es P o S, X₆ es P, Q, Y, o L (SEC ID NO: 153). En algunas realizaciones, HVR-H2 comprende la secuencia GRIYPX₁X₂GSTX₃YADSVKG, en la cual X₁ es T o L, X₂ es N, Y, S, G, A, o Q; X₃ es N o H (SEC ID NO: 154).

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 aislado que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs, donde cada HVR comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada entre SEC ID NOS: 1-18, 48-131 y 140-145 y donde SEC ID NO: 1, 7, 13, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 o 143 corresponde a una HVR-H1, SEC ID NO: 2, 8, 14, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127 o 144 corresponde a una HVR-H2, SEC ID NO: 3, 9, 15, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128 o 145 corresponde a una HVR-H3, SEC ID NO: 4, 10, 16, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129 o 140 corresponde a una HVR-L1, SEC ID NO: 5, 11, 17, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130 o 141 corresponde a una HVR-L2 y SEC ID NO: 6, 12, 18, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131 o 142 corresponde a una HVR-L3.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 1, 7, 13, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126 o 143.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una HVR-H2 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 2, 8, 14, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127 o 144.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una HVR-H3 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 3, 9, 15, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128 o 145.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una región HVR-L1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 4, 10, 16, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129 o 140.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una región HVR-L2 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 5, 11, 17, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130 o 141.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende una región HVR-L3 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 6, 12, 18, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131 o 142.

En un aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una de éstas, en orden, comprende SEC ID NO: 1, 2, 3, y/o una región variable de cadena liviana que comprende una HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, contiene SEC ID NO: 4, 5, 6.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 7, 8, 9, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 10, 11, 12.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 13, 14, 15, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, LVR-L2 y LVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 16, 17, 18.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 48, 49, 50, y/o una región variable de cadena liviana HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 51, 52, 53.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 54, 55, 56, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 57, 58, 59.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 60, 61, 62, 63, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 60, 61, 62, 63, 64, 65.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-LH, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 66, 67, 68, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 69, 70, 71.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 72, 73, 74, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 75, 76, 77.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 78, 79 80, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 81, 82, 83.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 84, 85, 86, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 87, 88, 89.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 90, 91, 92, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 93, 94, 95.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 96, 97, 98, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 99, 100, 101.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 102, 103, 104, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 105, 106, 107.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 108, 109, 110, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 111, 112, 113.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 114, 115, 116, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 117, 118, 119.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 120, 121, 122, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 123, 124, 125.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 126, 127, 128, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 129, 130, 131.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 140, 141, 142, y/o una región variable de cadena liviana que comprende HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, donde cada una, en ese orden, comprende SEC ID NO: 143, 144, 145.

Las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 1-18, 48-131 y 140-145 están numeradas con respecto a una HVR individual (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, numeración que coincide con el sistema de numeración de Kabat que se describe más adelante.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 132 y una región variable de cadena liviana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 133 y una región variable de cadena pesada.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 132 y una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 133.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 134 y una región variable de cadena liviana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 135 y una región variable de cadena pesada.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 139 y una región variable de cadena pesada. En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 134 y una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 135.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 136 y una región variable de cadena liviana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 137 y una región variable de cadena pesada.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 136 y una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 137.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 138 y una región variable de cadena liviana.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 139, y una región variable de cadena pesada.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-FGFR3 comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 138 y una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 139.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende: por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) HVR-L1 que comprende la secuencia SASSSVSYMH (SEC ID NO: 155), SASSSVSYMH (SEC ID NO: 156) o LASQTIGTWLA (SEC ID NO: 157),

(b) HVR-L2 que comprende la secuencia TWIYDTSILAS (SEC ID NO: 158), RWIYDTSKLAS (SEC ID NO: 159), o LLIYAATSLAD (SEC ID NO: 160),

(c) HVR-L3 que comprende la secuencia QQWTSNPLT (SEC ID NO: 161), QQWSSYPPT (SEC ID NO: 162), o QQLYSPWWT (SEC ID NO: 163),

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia GYSFTDYNMY (SEC ID NO: 164), GYVFTHYNMY (SEC ID NO: 165), o GYAFTSYNMY (SEC ID NO: 166),

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 167), WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 168), o WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 169) y

(f) HVR-H3 que comprende la secuencia ASPNYYDSSPFAY (SEC ID NO: 170), ARGQGPFDV (SEC ID NO: 171), o ARWGDYDVGAMDY (SEC ID NO: 172).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti- FGFR3 que comprende: por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionada del grupo que consiste en:

(a) HVR-L1 que comprende la secuencia SASSSVSYMH (SEC ID NO: 155),

(b) HVR-L2 que comprende la secuencia TWIYDTSILAS (SEC ID NO: 158),

(c) HVR-L3 que comprende la secuencia QQWTSNPLT (SEC ID NO: 161),

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia GYSFTDYNMY (SEC ID NO: 164),

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 167) y

(f) HVR-H3 que comprende la secuencia ASPNYYDSSPFAY (SEC ID NO: 170).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti- FGFR3 que comprende: por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionada del grupo que consiste en:

(a) HVR-L1 que comprende la secuencia SASSSVSYMH (SEC ID NO: 156),

(b) HVR-L2 que comprende la secuencia RWIYDTSKLAS (SEC ID NO: 159),

(c) HVR-L3 que comprende la secuencia QQWSSYPPT (SEC ID NO: 162),

(d) HVR-H1 que comprende la secuencia GYVFTHYNMY (SEC ID NO: 165),

(e) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 168) y

(f) HVR-H3 que comprende la secuencia ARGQGPFDV (SEC ID NO: 171).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende: por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, y/o seis secuencias de región hipervariable (HVR) seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) HVR-L1 que comprende la secuencia LASQTIGTWLA (SEC ID NO: 157),
- (b) HVR-L2 que comprende la secuencia LLIYAATSLAD (SEC ID NO: 160),
- (c) HVR-L3 que comprende la secuencia QQLYSPPWT (SEC ID NO: 163),
- (d) HVR-H1 que comprende la secuencia GYAFTSYNMY (SEC ID NO: 166),
- (e) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 169) y
- (f) HVR-H3 que comprende la secuencia ARWGDYDVGAMDY (SEC ID NO: 172).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende (a) una cadena liviana que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia SASSSVSYM (SEC ID NO: 155); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia TWIYDTSILAS (SEC ID NO: 158) y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia QQWTSNPLT (SEC ID NO: 161) ; y/o (b) una cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia GYSFTDYNMY (SEC ID NO: 164); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 167) y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia ASPNYDSSPFAY (SEC ID NO: 170).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende (a) una cadena liviana que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia SASSSVSYM (SEC ID NO: 156); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia RWIYDTSKLAS (SEC ID NO: 159) y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia QQWSSYPPT (SEC ID NO: 162) ; y/o (b) una cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia GYVFTHYNMY (SEC ID NO: 165); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 168) y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia ARGQGPFDV (SEC ID NO: 171).

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que comprende (a) una cadena liviana que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia LASQTIGTWLA (SEC ID NO: 157); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia LLIYAATSLAD (SEC ID NO: 160) y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia QQLYSPPWT (SEC ID NO: 163) y/o (b) una cadena pesada que

comprende (i) HVR–H1 que comprende la secuencia GYAFTSYNMY (SEC ID NO: 166); (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEC ID NO: 169) y (iii) HVR–H3 que comprende la secuencia ARWGDYDVGAMDY (SEC ID NO: 172). Algunas realizaciones de anticuerpos de la invención comprenden un dominio variable de cadena liviana de anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5–8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (al que también se hace referencia en la patente de los Estados Unidos No. 6.407.213 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073–1093) como se demuestra en SEC ID NO: 173.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (SEC ID NO: 173) (los residuos de HVR están
subrayados)

En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena liviana huMAb4D5–8 está modificada en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His indicadas en negrita/cursiva en el párrafo anterior, respectivamente). En una realización específica, la secuencia huMAb4D5–8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66, y/o Ser en la posición 91. En consecuencia, en una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia expuesta a continuación en SEC ID NO: 174:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
Ile Lys 107 (SEC ID NO: 174) (Los residuos de HVR están
subrayados)

Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 están indicados en **negrita/cursiva**.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia marco de dominio variable adecuada, siempre que se mantenga sustancialmente la actividad de unión a FGFR3. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia marco de consenso de cadena pesada humana del subgrupo III. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia marco de consenso comprende una sustitución en la posición 71, 73, y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias marco de dominio variable de cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (a las que también se hace referencia en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.407.213 & 5.821.337 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093). En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia marco de consenso de cadena liviana humana κI. En una realización específica, estos anticuerpos comprenden secuencias de HVR de cadena liviana de huMAb4D5-8 descritas en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.407.213 & 5.821.337.) En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominios variables de cadena liviana de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (a las que también se hace referencia en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.407.213 & 5.821.337 y Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093).

En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias HVR H1, H2, y H3 son SEC ID NOS: 13, 14 y/o 15, respectivamente. En otra realización, la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214, 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias HVR H1, H2, y H3 son SEC ID NOS: 48, 49 y/o 50, respectivamente.. En una realización adicional, la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-

214 , 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias HVR H1, H2, y H3 son SEC ID NOS: 84, 85, y/o 86, respectivamente.. En una realización adicional, la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 19 y 203-205, 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214 , 23 y 215-217, 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226, 27 y 227-229, 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238, 31 y 239-241, 32 y 242-244, 33 y 245-247, 34 y 248-250, 35 y 251-253, 36 y 254-256, y/o 37 y 257-259, y las secuencias HVR H1, H2, y H3 son SEC ID NOS: 108, 109, y/o 110, respectivamente.

En una realización específica, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271, y las secuencias de HVR, L1, L2 y L3 son SEC ID NOS: 16, 17 y/o 18, respectivamente. En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 8 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271, y las secuencias de HVR, L1, L2 y L3 son SEC ID NOS: 51, 52 y/o 53, respectivamente. En una realización adicional, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 338 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271 y las secuencias de HVR, L1, L2 y L3 son SEC ID NOS: 87, 88 y/o 89, respectivamente. En otra de las realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 38 y 260-262, 39 y 263-265, 40 y 266-268, y/o 41 y 269-271 y las secuencias de HVR, L1, L2 y L3 son SEC ID NOS: 111, 112, y/o 113, respectivamente. En otra de las realizaciones, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena liviana, donde la secuencia marco comprende la secuencia de SEC ID NOS: 38, 39, 40, y/o 41 y las secuencias de HVR, L1, L2 y L3 son SEC ID NOS: 132, 133 y/o 134, respectivamente.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID NO: 132 y/o un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEC ID NO: 133. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID NO: 134 y/o

un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEC ID NO: 135. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID NO: 136 y/o un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEC ID NO: 137. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID NO: 138 y/o un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de SEC ID NO: 139.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que se une a un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos: LAVPAANTVRFRCPA (SEC ID NO: 179) y/o SDVEFHCKVYSDAQP (SEC ID NO: 180).

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los números de aminoácidos 164–178 y/o 269–283 de la secuencia de aminoácidos del FGFR3 humano maduro.

En una realización, un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención se une específicamente a una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia LAVPAANTVRFRCPA (SEC ID NO: 179) y/o SDVEFHCKVYSDAQP (SEC ID NO: 180).

En un aspecto, el anticuerpo anti-FGFR3 de la presente invención se une a por lo menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los residuos 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 y/o 318 del polipéptido FGFR3 IIIb, o residuos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc. Una persona con capacitación normal en la técnica sabe cómo alinear las secuencias de FGFR3 para identificar los residuos correspondientes entre las respectivas secuencias de FGFR3. Las combinaciones de dos o más residuos pueden incluir cualquiera de los residuos 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 y/o 318 del polipéptido FGFR3 IIIb o residuos equivalentes del polipéptido FGFR3 IIIc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 se une a por lo menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los residuos 158, 159, 169, 170,

171, 173, 175, 205, 207, y/o 315 del polipéptido FGFR3 IIIb, o residuos equivalentes del polipéptido de FGFR3 IIIc. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 se une a por lo menos uno, dos tres, cuatro, o cualquier número hasta la totalidad de los residuos 158, 170, 171, 173, 175, y/o 315 del polipéptido FGFR3 IIIb, o residuos equivalentes del polipéptido de FGFR3 IIIc.

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que compite con cualquiera de los anticuerpos antes mencionados por la unión a FGFR3. En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 que se une al mismo epítotope o a otro similar de FGFR3 que cualquiera de los anticuerpos antes mencionados.

Como se conoce en la técnica y se describe en forma más detallada más adelante, la posición de aminoácido/límite que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (que se describe más adelante). Algunas posiciones dentro de un dominio variable se pueden visualizar como posiciones hipervariables híbridas por el hecho de que estas posiciones se pueden considerar incluidas en una región hipervariable según una serie de criterios, en tanto que se consideran fuera de una región hipervariable según una serie de criterios diferente. También se puede encontrar una o más de estas posiciones en regiones hipervariables extendidas (como se define más adelante más claramente).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano con afinidad madurada, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv.

En alguna realización, el anticuerpo para FGFR3 es un anticuerpo de un solo brazo (es decir, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena liviana forman un solo brazo de unión al antígeno) que comprende una región Fc, donde la región Fc comprende un primero y un segundo polipéptido Fc, donde el primero y segundo polipéptidos Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión al antígeno. Ver, por ej., WO2006/015371.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo un anticuerpo que comprende secuencias de unión al antígeno de un donador no humano injertado a una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ej., secuencias marco y/o de dominio constante). En una realización, el donador no humano es un ratón. En una realización adicional, una secuencia de unión al antígeno es sintética, por ej., se la obtiene por mutagénesis (por ej., selección por exhibición de fagos, etc.). En una realización específica, un anticuerpo quimérico de la invención tiene regiones murinas V y una región humana C. En una realización, la región murina de cadena liviana V está fusionada a una cadena liviana humana kappa. En otra realización, la región murina de cadena pesada V está fusionada a una región de IgG1 humana C.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen los que tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco (FR) y variantes con maduración de la afinidad con cambios en las CDRs injertadas. Los aminoácidos sustituidos en las CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo donador o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden asimismo cambios en los residuos aminoácidos de la región Fc que llevan a una función efectora mejorada que incluye una función CDC y/o ADCC y matanza de células B potenciadas. Otros anticuerpos de la invención incluyen los que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden cambios en los residuos aminoácidos de la región Fc que llevan a una función efectora disminuida, por ej., función de CDC y/o ADCC reducida y/o matanza de células B reducida. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una unión reducida (tal como ausencia de unión) al factor de complemento humano C1q y/o al receptor Fc humano en las células killer (destructoras) naturales (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por la unión reducida (tal como ausencia de unión) a FcγRI, FcγRIIA, y/o FcγRIIIA humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son de la clase IgG (por ej., IgG1 o IgG4) y comprenden por lo menos una mutación en E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, y/o P329 (numeración de acuerdo con el Índice de la EU). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden las mutaciones L234A/L235A o D265A/N297A.

En los casos en que el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato acoplado a la misma. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato maduro que carece de fucosa unida a una

región Fc del anticuerpo en la Sol. de Pat de los Estados Unidos No US 2003/0157108 (Presta, L.). Ver también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisectriz (GlcNAc) en el carbohidrato acoplado a una región Fc del anticuerpo fueron mencionados en WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y en la Patente de Estados Unidos No. 6.602.684, Umana et al. Los anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido acoplado a la región Fc del anticuerpo fueron dados a conocer en WO 1997/30087, Patel et al. Ver asimismo, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refiere a anticuerpos con carbohidratos alterados acoplados a la región Fc de los mismos. Ver asimismo US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión al antígeno con glicosilación modificada. En un aspecto, la invención presenta polipéptidos de unión a FGFR3 que comprenden cualquiera de las secuencias de unión al antígeno presentadas en este documento, donde los polipéptido de unión a FGFR3 se unen específicamente a un FGFR3, por ej., un FGFR3 humano y/o cyno y/o ratón.

Los anticuerpos de la invención se unen (por ejemplo se unen específicamente) a FGFR3 (por ej. FGFR3-IIIb y/o FGFR3-IIIc), y en algunas realizaciones, pueden modular (por ej. inhibir) uno o más aspectos de la señalización de FGFR3 (como por ejemplo la fosforilación del FGFR3) y/o la alteración de cualquier vía biología del ligando FGFR3 y/o FGFR3 biológicamente relevante y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo de las células o un cáncer, y/o el tratamiento y/o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad del FGFR3 (tal como expresión y/o actividad incrementada de FGFR3). En algunas realizaciones, el anticuerpo de FGFR3 se une específicamente a un polipéptido que consiste en o consiste esencialmente en un FGFR3 (por ej., un FGFR3 humano o de ratón). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a FGFR3 con una Kd de 1×10^{-7} M o mayor.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 de la invención no es un anticuerpo anti-FGFR3 descrito en la Publicación de patente de los Estados Unidos No. 2005/0147612 (por ej., el anticuerpo MSPRO2, MSPRO12, MSPRO59, MSPRO11, MSPRO21, MSPRO24, MSPRO26, MSPRO28, MSPRO29, MSPRO43, MSPRO55), el anticuerpo descrito por Rauchenberger et al, J Biol Chem 278 (40):38194–38205 (2003); un anticuerpo descrito en la Publicación PCT No. WO2006/048877 (por ej., el anticuerpo PRO-001), un anticuerpo descrito por Martínez-Torrecuadrada et al, Mol Cancer Ther (2008) 7(4): 862–873 (por ej., scFvαFGFR3 3C), un anticuerpo descrito por Drenzo, R et al (2007)

Proceedings of AACR Annual Meeting, Extracto No. 2080 (por ej., D11), o un anticuerpo descrito en WO 2010/002862 (por ej., los anticuerpos 15D8, 27H2, 4E7, 2G4, 20B4).

En un aspecto, la invención presenta composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención presenta ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo FGFR3 de la invención.

En otro de sus aspectos, la invención presenta vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

En otro aspecto, la invención presenta composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención presenta células huésped que comprenden un ácido nucleico o vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo un vector recombinante tal como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de células huésped. En una realización, una célula huésped es una célula procariota, como por ejemplo E. coli. En otra realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo una célula de mamífero tal como una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

En otro aspecto, la invención presenta métodos para la preparación de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención presenta métodos para preparar un anticuerpo anti-FGFR3 (que, como se define en la presente, incluye el anticuerpo de longitud total y fragmentos del mismo, método que comprende expresar en una célula huésped un vector recombinante de la invención que codifica el anticuerpo y recuperar el anticuerpo. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de manera que se exprese el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, se recupera el anticuerpo del medio de cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, el método comprende además combinar el anticuerpo recuperado con un vehículo, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable para preparar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado.

En un aspecto, la invención presenta un artículo de fabricación que comprende un envase y una composición contenida dentro del envase, donde la

composición comprende uno o más anticuerpos FGFR3 de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En otra realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende asimismo un vehículo que es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ej., el anticuerpo) a un individuo (como por ejemplo instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en la presente).

En otro aspecto, la invención presenta un kit que comprende un primer envase que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-FGFR3 de la invención y un segundo envase que comprende un buffer. En una realización, el buffer es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un vehículo que es farmacéuticamente aceptable. En otra realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ej., el anticuerpo) a un individuo.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar como medicamento.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno, como por ejemplo una condición patológica asociada a la activación y/o expresión (en algunas realizaciones, la sobreexpresión) del FGFR3. En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno tal como un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar en la reducción de la proliferación celular.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar en la destrucción de una célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula se

destruye por ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa el FGFR3.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención para usar en la reducción hasta el agotamiento de las células, como por ejemplo células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula se destruye por ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa FGFR3.

En otro aspecto, la invención presenta el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En un aspecto, la invención presenta el uso de un ácido nucleico de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En otro aspecto, la invención presenta el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno

proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En otro de sus aspectos, la invención presenta use of una célula huésped de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En otro aspecto, la invención presenta además el uso de un artículo de fabricación de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En un aspecto, la invención presenta además el uso de un kit de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una condición patológica asociada a la activación y/o expresión del FGFR3 (en algunas realizaciones, la sobreexpresión). En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer, un tumor y/o un trastorno

proliferativo de las células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de las células es el mieloma múltiple o cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), el cáncer de mama o el cáncer de hígado. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o el síndrome de craneosinostosis.

En otro aspecto, la invención presenta el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención en la preparación de un medicamento para la inhibición de la proliferación celular. En otro aspecto, la invención presenta el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención en la preparación de un medicamento para destruir células. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula se destruye por ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa FGFR3.

En otro aspecto, la invención presenta el uso de un anticuerpo anti-FGFR3 de la invención en la preparación de un medicamento para el agotamiento de las células, como por ejemplo células de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula se destruye por ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa FGFR3.

La invención presenta métodos y composiciones útiles para la modulación de trastornos asociadas con la expresión y/o señalización del FGFR3, como por ejemplo la expresión y/o señalización incrementada o expresión y/o expresión peligrosa.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para afectar cualquier estado patológico adecuado. En la presente se describen trastornos a manera de ejemplo e incluyen un cáncer seleccionado del grupo que consiste en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral (por ej., neuroblastoma o meningioma), cáncer de piel (por ej., melanoma, carcinoma de células basales o carcinoma de células escamosas), cáncer de vejiga (por ej., carcinoma de células transicionales), carcinoma mamario, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y malignidades hematológicas (por ej., leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia mielógena aguda (AML), malignidades de células

B, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple). En algunas realizaciones, el trastorno es carcinoma invasivo de células transicionales. En algunas realizaciones, el trastorno es mieloma múltiple. Otros ejemplos de trastornos incluyen los trastornos esqueléticos tales como acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

En ciertas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3, FGFR3 amplificado, FGFR3 traslocado y/o FGFR3 mutado. En ciertas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 activado. En ciertas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 traslocado (por ej., una traslocación t(4;14)). En ciertas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 constitutivo. En algunas realizaciones, el FGFR3 constitutivo comprende una mutación en el dominio de tirosina quinasa y/o el dominio yuxtamembrana y/o un dominio de unión al ligando. En ciertas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 independiente de ligandos. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 dependiente del ligando.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S248C}. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{S248C} y/o FGFR3-IIIc^{S248C}.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{K652E}. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{K652E} y/o FGFR3-IIIc^{K650E}.

FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{S249C}. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{S249C} y/o FGFR3-IIIc^{S249C}.

En un aspecto, el cáncer expresa FGFR3 que comprende una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{G372C}. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{G372C} y/o FGFR3-IIIc^{G370C}.

En un aspecto, el cáncer expresa FGFR3 que comprenden una mutación correspondiente a FGFR3-IIIb^{Y375C}. En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{Y375C} y/o FGFR3-IIIc^{Y373C}.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{K652E} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{R248C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa (a) FGFR3-IIIb^{G372C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{R248C}.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.

En ciertas realizaciones, el cáncer expresa niveles incrementados de fosfo-FGFR3, fosfo-FRS2 y/o fosfo-MAPK en comparación con una muestra control (por ej., una muestra de tejido normal) o nivel.

En algunas realizaciones, el cáncer expresa (por ej., sobre la superficie celular) aproximadamente 10.000 moléculas de FGFR3 por célula o más (como por ejemplo 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000 o más receptores FGFR3). En algunas realizaciones, el cáncer expresa aproximadamente 13000 moléculas de FGFR3. En otras realizaciones, el cáncer expresa aproximadamente 5000, 6000, 7000, 8000, o más moléculas de FGFR3. En algunas realizaciones, el cáncer expresa menos de aproximadamente 4000, 3000, 2000, 1000, o menos moléculas de FGFR3. En algunas realizaciones, el cáncer expresa menos de aproximadamente 1000 moléculas de FGFR3.

En una realización, una célula tomada como objetivo en un método de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer mamario, una célula de cáncer colorectal, una célula de cáncer de pulmón (por ej., una célula de cáncer de pulmón de células no pequeñas), una célula de cáncer de tiroides, una célula de mieloma múltiple, una célula de cáncer testicular, una célula de carcinoma papilar, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga (por ej., una célula de una célula de carcinoma de células transicionales), una célula de carcinoma gástrico, una célula ecamosa de carcinoma de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de leucemia, una célula de mieloma múltiple (por ej. una célula de mieloma múltiple que comprende una traslocación t(4:14) de FGFR3) y una célula de adenoma de colon. En una realización, una célula tomada como objetivo en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En otra realización, una célula que es tomada como objetivo en un método de la invención es una célula displásica. En otra de las realizaciones, célula que es tomada como objetivo en un método de la invención es una célula metastática.

En un aspecto, la invención presenta métodos para inhibir la proliferación celular en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR3 para reducir la proliferación celular.

En un aspecto, la invención presenta métodos para destruir una célula en un sujeto, donde el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR3 para destruir una célula. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, la célula es destruida por la ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa FGFR3.

En un aspecto, la invención presenta métodos para reducir el número de células hasta agotarlas (como por ejemplo células de mieloma múltiple) en un sujeto, donde el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR3 para destruir una célula. En algunas realizaciones, la célula se destruye por ADCC. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo desnudo. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa FGFR3.

En un aspecto, la invención presenta métodos para el tratamiento o prevención de un trastorno esquelético. En algunas realizaciones, el trastorno es acondroplasia, hipocondroplasia, enanismo, displasia tanatofórica (TD; formas clínicas TD1 y TDII), o síndrome de craneosinostosis.

Los métodos de la invención pueden comprender además otros pasos de tratamiento. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además un paso en que una célula y/o tejido (por ej., una célula cancerosa) se expone al tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico.

En un aspecto, la invención presenta métodos que comprenden la administración de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-FGFR3 en combinación con una cantidad efectiva de otro agente terapéutico (tal como un agente anti-angiogénesis, otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inmunosupresor, una prodroga, una citoquina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna contra el cáncer, un analgésico o un agente inhibidor del crecimiento). Por ejemplo, se utilizan anticuerpos anti-FGFR3 en combinación con un agente anticanceroso o un agente antiangiogénico para tratar diversas condiciones neoplásicas o no neoplásicas. En ejemplos específicos, se utilizan los anticuerpos anti-FGFR3 en combinación con velcade, revlimid, tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol,

irinotecano, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, bevacizumab, vincristina, cisplatino, gemcitabina, metotrexato, vinblastina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, 5-fluorouracilo, doxorubicina, bortezomib, lenalidomide, dexametasona, melfalin, prednisona, vincristina y/o talidomida.

Dependiendo de la indicación de cáncer específica a tratar, se puede combinar la terapia combinatoria de la presente invención con otros agentes terapéuticos tales como agentes quimioterapéuticos, o terapias adicionales tales como radioterapia o cirugía. Se pueden emplear numerosos agentes quimioterapéuticos conocidos en la terapia combinatoria de la presente invención. De preferencia, se utilizan los agentes quimioterapéuticos habituales para el tratamiento de las indicaciones específicas. La dosis o la frecuencia de cada agente terapéutico que se ha de utilizar en la combinación es, preferentemente, la misma o inferior a la dosis o frecuencia del agente correspondiente cuando se lo utiliza sin el otro u otros agentes.

En otro aspecto, la invención presenta cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR3 descritos en la presente, donde el anticuerpo anti-FGFR3 comprende un marcador detectable.

En otro aspecto, la invención presenta un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-FGFR3 descritos en la presente y FGFR3. En algunas realizaciones, el complejo es in vivo o in vitro. En algunas realizaciones, el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-FGFR3 está marcado en forma detectable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

Clon 184.6 (HVR-H1 es SEC ID NO: 1; HVR-H2 es SEC ID NO: 2; HVR-H3 es SEC ID NO: 3; HVR-L1 es SEC ID NO: 4; HVR-L2 es SEC ID NO: 5; HVR-L3 es SEC ID NO: 6);

Clon 184.6.1 (HVR-H1 es SEC ID NO: 7; HVR-H2 es SEC ID NO: 8; HVR-H3 es SEC ID NO: 9; HVR-L1 es SEC ID NO: 10; HVR-L2 es SEC ID NO: 11; HVR-L3 es SEC ID NO: 12)

Clon 184.6.58 (HVR-H1 es SEC ID NO: 13; HVR-H2 es SEC ID NO: 14; HVR-H3 es SEC ID NO: 15; HVR-L1 es SEC ID NO: 16; HVR-L2 es SEC ID NO: 17; HVR-L3 es SEC ID NO: 18)

Clon 184.6.62 (HVR-H1 es SEC ID NO: 48; HVR-H2 es SEC ID NO: 49; HVR-H3 es SEC ID NO: 50; HVR-L1 es SEC ID NO: 51; HVR-L2 es SEC ID NO: 52; HVR-L3 es SEC ID NO: 53)

Clon 184.6.21 (HVR-H1 es SEC ID NO: 54; HVR-H2 es SEC ID NO: 55; HVR-H3 es SEC ID NO: 56; HVR-L1 es SEC ID NO: 57; HVR-L2 es SEC ID NO: 58; HVR-L3 es SEC ID NO: 59)

Clon 184.6.49 (HVR-H1 es SEC ID NO: 60; HVR-H2 es SEC ID NO: 61; HVR-H3 es SEC ID NO: 62; HVR-L1 es SEC ID NO: 63; HVR-L2 es SEC ID NO: 64; HVR-L3 es SEC ID NO: 65)

Clon 184.6.51 (HVR-H1 es SEC ID NO: 66; HVR-H2 es SEC ID NO: 67; HVR-H3 es SEC ID NO: 68; HVR-L1 es SEC ID NO: 69; HVR-L2 es SEC ID NO: 70; HVR-L3 es SEC ID NO: 71)

Clon 184.6.52 (HVR-H1 es SEC ID NO: 72; HVR-H2 es SEC ID NO: 73; HVR-H3 es SEC ID NO: 74; HVR-L1 es SEC ID NO: 75; HVR-L2 es SEC ID NO: 76; HVR-L3 es SEC ID NO: 77)

Clon 184.6.92 (HVR-H1 es SEC ID NO: 78; HVR-H2 es SEC ID NO: 79; HVR-H3 es SEC ID NO: 80; HVR-L1 es SEC ID NO: 81; HVR-L2 es SEC ID NO: 82; HVR-L3 es SEC ID NO: 83)

Clon 184.6.1.N54S (HVR-H1 es SEC ID NO: 84; HVR-H2 es SEC ID NO: 85; HVR-H3 es SEC ID NO: 86; HVR-L1 es SEC ID NO: 87; HVR-L2 es SEC ID NO: 88; HVR-L3 es SEC ID NO: 89)

Clon 184.6.1.N54G (HVR-H1 es SEC ID NO: 90; HVR-H2 es SEC ID NO: 91; HVR-H3 es SEC ID NO: 92; HVR-L1 es SEC ID NO: 93; HVR-L2 es SEC ID NO: 94; HVR-L3 es SEC ID NO: 95)

Clon 184.6.1.N54A (HVR-H1 es SEC ID NO: 96; HVR-H2 es SEC ID NO: 97; HVR-H3 es SEC ID NO: 98; HVR-L1 es SEC ID NO: 99; HVR-L2 es SEC ID NO: 100; HVR-L3 es SEC ID NO: 101)

Clon 184.6.1.N54Q (HVR-H1 es SEC ID NO: 102; HVR-H2 es SEC ID NO: 103; HVR-H3 es SEC ID NO: 104; HVR-L1 es SEC ID NO: 105; HVR-L2 es SEC ID NO: 106; HVR-L3 es SEC ID NO: 107)

Clon 184.6.58.N54S (HVR-H1 es SEC ID NO: 108; HVR-H2 es SEC ID NO: 109; HVR-H3 es SEC ID NO: 110; HVR-L1 es SEC ID NO: 111; HVR-L2 es SEC ID NO: 112; HVR-L3 es SEC ID NO: 113)

Clon 184.6.58.N54G (HVR-H1 es SEC ID NO: 114; HVR-H2 es SEC ID NO: 115; HVR-H3 es SEC ID NO: 116; HVR-L1 es SEC ID NO: 117; HVR-L2 es SEC ID NO: 118; HVR-L3 es SEC ID NO: 119)

Clon 184.6.58.N54A (HVR-H1 es SEC ID NO: 120; HVR-H2 es SEC ID NO: 121; HVR-H3 es SEC ID NO: 122; HVR-L1 es SEC ID NO: 123; HVR-L2 es SEC ID NO: 124; HVR-L3 es SEC ID NO: 125)

Clon 184.6.58.N54Q (HVR-H1 es SEC ID NO: 126; HVR-H2 es SEC ID NO: 127; HVR-H3 es SEC ID NO: 128; HVR-L1 es SEC ID NO: 129; HVR-L2 es SEC ID NO: 130; HVR-L3 es SEC ID NO: 131).

Clon 184.6.1.NS D30E (HVR-H1 es SEC ID NO: 143; HVR-H2 es SEC ID NO: 144; HVR-H3 es SEC ID NO: 145; HVR-L1 es SEC ID NO: 140; HVR-L2 es SEC ID NO: 141; HVR-L3 es SEC ID NO: 142).

Las posiciones de aminoácidos están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descripto más adelante.

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

Las FIGURAS 3A, 3B y 4: ilustran secuencias marco de consenso humanas ilustrativas de aceptores para usar al poner en práctica la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

Marcos de consenso de variables pesadas (VH) (FIG. 3A, 3B)

marco consenso subgrupo VH humana I menos CDRs Kabat (SEC ID NOS: 19 y 203-205)

marco consenso subgrupo VH humana I menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOS: 20 y 206-208, 21 y 209-211, 22 y 212-214)

marco consenso subgrupo VH humana II menos CDRs Kabat (SEC ID NOS: 23 y 215-217)

marco consenso subgrupo VH humana II menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOS: 24 y 218-220, 25 y 221-223, 26 y 224-226)

marco consenso subgrupo VH humana II menos extendidas

marco consenso subgrupo VH humana III menos CDRs Kabat (SEC ID NOS: 27 y 227-229)

marco consenso subgrupo VH humana III menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOS: 28 y 230-232, 29 y 233-235, 30 y 236-238)

marco aceptora VH humana menos CDRs Kabat (SEC ID NOS: 31 y 239-241)

marco aceptor VH humana menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOS: 32 y 242–244, 33 y 245–247)

marco aceptora VH humana 2 menos CDRs Kabat (SEC ID NOS: 34 y 248–250)

marco aceptora VH humana 2 menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID NOS: 35 y 251–253, 36 y 254–256, 37 y 257–259)

Marcos de consenso liviana (VL) (FIG. 4)

marco consenso VL kappa humana subgrupo I (SEC ID NOS: 38 y 260–262)

marco consenso VL kappa humana subgrupo II (SEC ID NO: 39 y 263–265)

marco consenso VL kappa humana subgrupo III (SEC ID NOS: 40 y 266–268)

marco consenso VL kappa humana subgrupo IV (SEC ID NOS: 41 y 269–271)

FIGURA 5: ilustra secuencias de la región de marco livianas de cadena pesada (SEC ID NOS: 42–45) y de cadena pesada (SEC ID NOS: 46, 47, 175, 176) de huMAb4D5–8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 6: ilustra secuencias de región marco modificadas/variantes de cadenas liviana (SEC ID NOS: 42, 43, 177, 45) y pesadas (SEC ID NOS: 46, 47, 178 y 176) de huMAb4D5–8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

FIGURA 7: La desactivación del FGFR3 en células de cáncer de vejiga RT112 inhibe la proliferación e induce la detención del ciclo de las células G1 in vitro y suprime el desarrollo de tumores in vivo. Se clonaron tres ARNsh en un vector de expresión inducible con Tet. Se establecieron las células RT112 que expresaban ARNsh de FGFR3 o un ARNsh control con selección con puromicina. (A) Transferencias representativas que exhibían expresión de FGFR3 en los clones seleccionados tratados con o sin doxiciclina (Dox, 0, 0,1 y 1 µg/ml, de izquierda a derecha). (B) Incorporación de [³H]–timidina por las células RT112 estables. Se cultivaron los clones estables de RT112 con o sin 1 µg/ml doxiciclina por espacio de 3 días antes de la incubación de 16 horas con [³H]–timidina (1 µCi por pocillo). Se normalizaron los recuentos de [³H]–timidina incorporada a la de las células sin inducción con doxiciclina. Las barras de error representan el SEM. (C) Histogramas de citometría de flujo por fluorescencia de las células RT112 estables. Se cultivaron los clones de RT112 que expresaban ARN control o ARNsh4 de FGFR3 con o sin 1 µg/ml de doxiciclina por espacio de 72 horas y se colorearon los núcleos con yoduro de propidio (PI). Se obtuvieron resultados

similares en el caso de los ARNsh2 y 6 de FGFR3 (Figura 16). (D) El desarrollo de las células RT112 que expresaban ARNsh control (n=9 por grupo de tratamiento) o ARNsh4 de FGFR3 (n=11 por grupo de tratamiento) en ratones. Se dio a los ratones sacarosa al 5% sola o suplementada con 1 mg/ml de doxiciclina y se midió el tamaño de los tumores dos veces por semana. Las barras de error representan el SEM. Se obtuvieron resultados similares en el caso del ARNsh2 y 6 (Figura 16). Panel inferior: Expresión de la proteína FGFR3 en lisados de tumores extraídos de tejidos de xenoinjerto de células estables con ARNsh control o ARNsh4 de FGFR3.

FIGURA 8: R3Mab bloquea la interacción FGF/FGFR3. (A) Unión selectiva del FGFR3 humano por R3Mab. Se inmovilizaron proteínas quiméricas Fc FGFR1–4 humanas y se las incubó con cantidades crecientes de R3Mab. Se detectó la unión específica empleando un anticuerpo Fab antihumano. (B–C) Bloqueo de la unión de FGF1 a FGFR3–IIIb (B) o IIIc (C) humano por R3Mab. Se detectó la unión específica empleando un anticuerpo policlonal biotinilado específico de FGF1. (D–E) Bloqueo de la unión de FGF9 al FGFR3–IIIb (D) o IIIc (E) humano por R3Mab. Se detectó la unión específica mediante el uso de un anticuerpo policlonal biotinilado específico para FGF9. Las barras de error representan el error standard de la media (SEM) y en ocasiones son de menor tamaño que los símbolos.

FIGURA 9: R3Mab inhibe la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3 de tipo salvaje y mutado. (A) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la viabilidad de células Ba/F3 que expresan el FGFR3–IIIb humano de tipo salvaje. Se cultivaron las células en medio sin FGF1 (sin FGF1), o en presencia de 10 ng/ml de FGF1 más 10 μ g/ml de heparina sola (FGF1), o en combinación con un anticuerpo control (Control) o R3Mab. Se evaluó la viabilidad de las células con CellTiter–Glo (Promega) al cabo de 72 h de incubación con anticuerpos. (B) Inhibición de la fosforilación de FGFR3 y MAPK por R3Mab en células estables Ba/F3–FGFR3–IIIb^{WT}. Se trataron las células con 15 ng/ml de FGF1 y 10 μ g/ml de heparina (+) o heparina sola (–) por espacio de 10 minutos, después de la preincubación con un Ab Control (Ctrl), reduciendo la cantidad de R3Mab (1, 0,2, 0,04 μ g/ml respectivamente) en PBS, o PBS solo (Simulado) durante 3 horas. Se sometió a los lisados a inmunotransferencia para evaluar la fosforilación de FGFR3 y p44/42 MAPK con anticuerpos para pFGFR^{Y653/654} y pMAPK^{Thr202/Tyr204} respectivamente. (C) Representación esquemática de puntos calientes de mutación (“hot spots” de FGFR3 y la frecuencia en el cáncer de vejiga (el número

de secuencia expuesto se basa en la secuencia de aminoácidos de la isoforma IIIb de FGFR3) sobre la base de los datos publicados (32). TM, dominio transmembrana; TK1 y TK2, dominio de tirosina quinasa 1 y 2. (D–H) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la viabilidad de células Ba/F3 que expresan mutantes de FGFR3 asociadas al cáncer. Se obtiene G372C de la isoforma IIIc y el resto se obtiene de la isoforma IIIb. La numeración de las secuencias correspondientes a todos los mutantes se basa en la secuencia de aminoácidos de la isoforma IIIb de FGFR3 (incluyendo el mutante G372C, que llevaría el número G370C basándose en la secuencia de aminoácidos de la isoforma IIIc de FGFR3). Se evaluó la viabilidad de las células al cabo de 72 horas de incubación con anticuerpos como se describe en (A). Las barras de error representan el SEM.

FIGURA 10: Mapeo de epítopes correspondientes a R3Mab y estructura cristalina del complejo entre el fragmento Fab R3Mab e IgD2–D3 del FGFR3–IIIb humano. (A) Epítipo determinado por la unión de 13 péptidos que abarcan IgD2–D3 del FGFR3 humano a R3Mab. Se capturó cada péptido biotinilado en un pocillo de microtituladora revestido con estreptavidina y se lo incubó con R3Mab. Se detectó el R3Mab unido específicamente utilizando un anticuerpo IgG anti–humano de cabra. (B) Alineamiento de secuencias de los péptidos de FGFR3 humanos 3 (LAVPAANTVRFRCPA (SEC ID NO: 179) y 11 SDVEFHCKVYSDAQ (SEC ID NO: 180) con segmentos extracelulares de FGFR1 humano (péptido 3: HAVPAAKTVKFKCPS (SEC ID NO: 181); péptido 11: SNVEFMCKVYSDPQP (SEC ID NO: 182)). Los residuos de FGFR1 que participan en la interacción primaria FGF2–FGFR1, la unión de heparina y la asociación receptor–receptor están indicados en **negrita**, *cursiva* y letra subrayada, respectivamente. La asignación funcional de los residuos FGFR1 se basa en Plotnikov et al (34). (C) Estructura del Fab R3Mab (expuesto en hélice de cintas, cadena liviana gris, cadena pesada negro) en complejo con IgD2–D3 de FGFR3 humano (indicado en la superficie molecular, blanco). Los residuos del receptor implicados en la unión al ligando y la dimerización están colorados en gris/sombreados con cuadrícula y gris oscuro, respectivamente, basándose en Plotnikov et al (34). (D) El primer plano de la estructura de los cristales demuestra que las CDR–H3 y –H2 del Fab constituyen los sitios de mayor interacción con IgD2 y IgD3 de FGFR3. (E) Superposición del complejo FGFR3–IIIc–FGF1 (código de PDB 1RY7) con el complejo FGFR3–IIIb–Fab. Se colorearon FGFR3–IIIc y FGF1 con gris y gris oscuro respectivamente. FGFR3–IIIb está indicado con blanco y el Fab está indicado en gris claro en el caso de la cadena liviana, gris oscuro en el de la

cadena pesada. Se utilizó IgD2 como anclaje para la superposición. Nótese la IgD2 bien superpuesta de ambas estructuras y la nueva conformación adoptada por IgD3 de FGFR3–IIIb al unirse a R3Mab. (F) Otra representación de la superposición del complejo FGFR3–IIIc–FGF1 (código de PDB 1RY7) con el complejo FGFR3–IIIb–Fab. FGFR3–IIIc y FGF1 aparecen en forma de superficies moleculares indicadas en gris/textura de malla y gris oscuro/textura de puntos, respectivamente. FGFR3–IIIb está indicado en blanco y el Fab está indicado con gris en el caso de la cadena liviana, negro en el caso de la cadena pesada. Se utilizó IgD2 como anclaje para la superposición. Nótese la IgD2 bien superpuesta de ambas estructuras y la nueva conformación adoptada por IgD3 de FGFR3–IIIb al unirse a R3Mab.

FIGURA 11: R3Mab inhibe la proliferación, el desarrollo de los clones y la señalización de FGFR3 en células de cáncer de vejiga que expresan FGFR3^{S249C} de tipo salvaje o mutado. (A) Inhibición de la incorporación de [³H]–timidina por R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RT112. Las barras de error representan el SEM. (B) Bloqueo de la señalización del FGFR3 activada por FGF1 por R3Mab (15 (g/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga RT112 en comparación con el medio de tratamiento solo (Simulado) o un anticuerpo control (Ctrl). Se inmunoprecipitaron lisados celulares con el anticuerpo anti–FGFR3 y se los evaluó con respecto a la fosforilación de FGFR3 con un anticuerpo anti–fosfo–tirosina (4G10). Se sometió a los lisados a inmunotransferencia para detectar la fosforilación de AKT (pAKTS473) y p44/42 MAPK (pMAPKThr202/Tyr204). (C) Inhibición del desarrollo de los clones por R3Mab (10 (g/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga UMUC–14 (que alberga el FGFR3^{S249C}) en comparación con el medio de tratamiento solo (Simulado) o un anticuerpo control (Ctrl). (D) Cuantificación del estudio de (C) que indica el número de colonias de más de 120 (m de diámetro por pocillo de un replicado de 12 pocillos. Las barras de error representan el SEM. $P < 3.4 \times 10^{-9}$ contra Simulado o Ctrl. (E) Inhibición de la fosforilación de FGFR3 en células UMUC–14 por R3Mab (15 (g/ml). Se analizó la fosforilación del FGFR3 en (B). Nótese la fosforilación constitutiva del FGFR3 en esta línea celular.

FIGURA 12: R3Mab reduce el nivel de estado estable del dímero FGFR3^{S249C} ligado por disulfuro impulsando el equilibrio dímero–monómero hacia el estado monomérico. (A) Efecto de R3Mab sobre el dímero FGFR3^{S249C} en células UMUC–14. Se incubaron las células con R3Mab (15 µg/ml) o un anticuerpo control (Ctrl) por espacio de 3 horas y se analizaron los lisados de

células enteras por inmunotransferencia en condiciones no reductoras y reductoras. (B) Efecto del bloqueante de sulfhidrilo libre DTNB sobre el equilibrio dímero FGFR3^{S249C}–monómero en células UMUC–14. Se trataron las células UMUC–14 con concentraciones crecientes de DTNB durante 3 horas y se analizaron los lisados celulares en (A). (C) Efecto de R3Mab sobre el dímero FGFR3^{S249C} recombinante purificado in vitro. El dímero FGFR3^{S249C} compuesto por IgD2–D3 fue purificado por columna de exclusión por tamaños y se lo incubó con PBS (Simulado), un anticuerpo control (Ctrl), o R3Mab a 37°C. Se colectaron las muestras en el momento indicado para el análisis de inmunotransferencia en condiciones no reductoras. Se detectó el dímero–monómero FGFR3 empleando el anticuerpo 6G1 anti–hibridoma FGFR3 (A–C).

FIGURA 13: R3Mab inhibe el desarrollo de xenoinjertos de células de cáncer de vejiga y el desarrollo de aloinjertos de Ba/F3–FGFR3^{S249C}. (A) Efecto de R3Mab sobre el desarrollo de xenoinjertos de cáncer de vejiga RT112 preestablecidos en comparación con el control con vehículo. n=10 por grupo. (B) Inhibición de la señalización de FGFR3 en tejidos tumorales RT112 por R3Mab. En un experimento separado, se recogieron tumores por xenoinjerto de RT112 tratados con 15 mg/kg de un anticuerpo control (Ctrl) o R3Mab por espacio de 48 horas o 72 horas (n =3 por grupo), se los homogeneizó y analizó para detectar la activación de FRS2 α y MAPK por inmunotransferencia. (C) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de aloinjertos preestablecidos de Ba/F3–FGFR3^{S249C}. n=10 por grupo. (D) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos preestablecidos de cáncer de vejiga UMUC–14, n=10 por grupo. (E) Efecto de R3Mab sobre el dímero FGFR3^{S249C} y señalización en tejidos de tumores UMUC–14. Se recogieron tumores por xenoinjerto de UMUC–14 tratados con 30 mg/kg de un anticuerpo control (Ctrl) o R3Mab durante 24 horas o 72 horas (n =3 por grupo), se los homogeneizó y analizó para detectar la activación del dímero–monómero FGFR3^{S249C} como así también MAPK por inmunotransferencia. Se detectó el dímero–monómero FGFR3 empleando un anticuerpo policlonal anti–FGFR3 de conejo sc9007 para evitar la interferencia de la IgG de ratón en los lisados tumorales. Las barras de error representan SEM.

FIGURA 14: La ADCC contribuye a la eficacia antitumoral de R3Mab en modelos de mieloma múltiple t(4;14) positivo. (A–B) Efecto de R3Mab sobre el crecimiento de xenoinjertos de mieloma OPM2 (A) y KMS11 (B) preestablecidos. n =10 por grupo. (C–F) Citólisis de las líneas celulares de mieloma OPM2 (C) y KMS11 (D), o las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 (E) y UMUC–14 (F)

inducido por R3Mab en cultivo celular. Se incubaron células de mieloma o cáncer de vejiga con PBMC humanas recién aisladas en presencia de R3Mab o un anticuerpo control. Se determinó la citotoxicidad midiendo la LDH liberada en el sobrenadante. (G–H) Efecto de R3Mab o su mutante DANA sobre el crecimiento de xenoinjertos de mieloma OPM2 (G) y KMS11 (H) preestablecidos. $n=10$ por grupo. Las barras de error representan SEM y en ocasiones son de menor tamaño que los símbolos.

FIGURA 15: La inactivación de FGFR3 con ARNsi inhibe la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer de vejiga. Se diseñaron seis a siete ARNsi de FGFR3 diferentes y tres ARNsi control no específicos y se los sintetizó en Genentech. Las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 (A), SW780 (B), RT4 (C) y UMUC-14 (D) fueron aplicadas a placas de 96 pocillos (3000 células por pocillo) y se las dejó adherir de un día para otro y se las transfectó transitoriamente con ARNsi 25 nM en complejo con RNAiMax (Invitrogen). 72 h después de la transfección, se agregó [^3H]-timidina (1 μCi por pocillo) al cultivo (A, C y D) durante 16 horas más de incubación. Se cuantificó la [^3H]-timidina incorporada con TopCount. Se normalizaron los datos a los de las células transfectadas con ARNiMax solo (Simulado). Las barras de error representan el SEM. Panel inferior: Transferencias representativas que demuestran la expresión de FGFR3 en células con ARNsi transfectado. (B) Se midió la viabilidad de las células con un CellTiter-Glo (Promega) 96 horas después de la transfección. Las barras de error representan SEM.

FIGURA 16: La activación de FGFR3 en la línea celular de cáncer de vejiga RT112 induce la detención del ciclo celular de G1 in vitro y suprime el desarrollo de tumores in vivo. Se diseñaron tres ARN de FGFR3 diferentes y se los clonó en un vector de expresión retroviral de ARNsh inducible por Tet. Se establecieron los clones RT112 estables que expresaban ARNsh de FGFR3 o ARNsh control con selección por puromicina. (A) Histogramas de citometría de flujo por fluorescencia de ADN de núcleos coloreados con yoduro de propidio (PI) obtenidos de células estables RT112 que expresaban ARNsh2 o ARNsh6 de FGFR3 después del tratamiento con o sin 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxíciclina por espacio de 72 horas. (B) El crecimiento de células RT112 estables que expresan ARNsh2–4 de FGFR3 ($n=11$ por grupo de tratamiento) o ARNsh6–16 de FGFR3 ($n=10$ por grupo de tratamiento) en ratones nu/nu. Los ratones con tumores recibieron sólo sacarosa al 5% (círculo pleno) o sacarosa al 5% más 1 mg/ml de doxíciclina (cuadrado

pleno) y se midieron los tumores con calibres dos veces por semana. Las barras de error representan el SEM.

FIGURA 17: Efecto de los anticuerpos anti-FGFR3 por hibridoma 16G, 6G1 y 15B2 sobre la proliferación de células Ba/F3 impulsada por FGFR3 de tipo salvaje y mutado. Se generaron anticuerpos por hibridoma anti-FGFR3 inmunizando ratones BALB/c con FGFR3-IIIb /Fc humano o químera FGFR3-IIIc /Fc humana. Se seleccionaron las células de hibridoma fusionadas utilizando selección con hipoxantina-aminopterina-timidina en Medio D del kit de selección por hibridoma ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá). Se seleccionaron sucesivamente anticuerpos por hibridoma por su capacidad para unirse a FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc por ELISA y para reconocer el FGFR3 de la superficie celular por FACS. A continuación se clonaron los hibridomas seleccionados limitando la dilución. 16G, 6G1 y 15B2 son los clones utilizados para evaluar el efecto sobre la proliferación de células Ba/F3 que expresan FGFR3 de tipo salvaje o mutado de manera similar a la descrita en la Figura 9A. Las barras de error representan el SEM.

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

FIGURA 19: R3Mab inhibe la proliferación y Señalización del FGFR3 en células de cáncer de vejiga que contienen FGFR3^{S249C} de tipo salvaje o mutado. (A) Inhibición de la viabilidad celular por R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RT4. Se evaluó la viabilidad de las células con CellTiter-Glo (Promega) después de 96 h de incubación con el anticuerpo. Las barras de error representan el SEM. (B) Bloqueo de la señalización activada por FGF1 del FGFR3 por R3Mab (15 ug/ml) en la línea celular de cáncer de vejiga RT4. (C) Inhibición de la incorporación de [³H]-timidina por R3Mab en la línea celular de cáncer de vejiga RCC-97-7 (con contenido de FGFR3^{S249C}). Las barras de error representan el SEM. (D) Inhibición de la fosforilación del FGFR3 en las células TCC-97-7 por R3Mab (15 ug/ml). (E) Reducción del dímero FGFR3^{S249C} en células TCC-97-7 al cabo de 3 horas de incubación con R3Mab (15 ug/ml) en comparación con un anticuerpo control (Ctrl).

FIGURA 20: Efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre la internalización de R3Mab y el dímero FGFR3^{S249C} en células UMUC-14. (A) los inhibidores de la endocitosis sobre la internalización de R3Mab. Se incubaron células UMUC-14, pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis o DMSO por espacio de 1 hora a 37°C, con R3Mab (15 ug/ml) durante 3 horas a 37°C para dar lugar a la internalización. Se utilizó un lavado de bajo pH para eliminar el R3Mab de la superficie celular a fin de visualizar el anticuerpo internalizado. Se fijaron las células y se las coloreó con IgG antihumana marcada con Alexa 488. Se captó la imagen empleando microscopía confocal. (B) Efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre el dímero FGFR3^{S249C} en células UMUC-14 tratadas con R3Mab. Se incubaron células UMUC-14, pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis o DMSO por espacio de 1 hora a 37°C, con el simulacro (Banda 1), un anticuerpo control (Banda 2), o R3Mab (15 ug/ml, Banda 3) durante 3 horas a 37°C. Se analizaron los lisados celulares para detectar la proteína FGFR3 en condiciones no reductoras o reductoras por inmunotransferencia. Nótese que la clorpromazina (inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina) y genisteína (paninhibidor de la endocitosis) bloquearon la internalización de R3Mab, pero no tuvieron efecto alguno sobre la disminución del dímero FGFR3^{S249C} inducido por R3Mab.

FIGURA 21: Sensibilidad para la detección de diferentes anticuerpos anti-FGFR3 del FGFR3^{S249C} monomérico y dimérico en condiciones no reductoras. Se lisaron células UMUC-14 después del tratamiento con R3Mab (Banda 1), una IgG1 control (Banda 2), o PBS (Banda 3) por espacio de 3 horas y se sometió a los lisados celulares a análisis de inmunotransferencia en condiciones reductoras o no reductoras. Nótese que 6G1 (anticuerpo murino por hibridoma generado en Genentech) detectó tanto el dímero como el monómero FGFR3^{S249C}, en tanto que sc9007 (anticuerpo policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology) o sc13121 (anticuerpo murino por hibridoma, Santa Cruz Biotechnology) detectó de manera preferente el FGFR3^{S249C} dimérico.

FIGURA 22: Efecto de R3Mab sobre la proliferación de t(4;14)+ células de mieloma múltiple. (A) Efecto inhibitorio de R3Mab sobre la incorporación de [³H]-timidina por las células UTMC-2. Se cultivaron células UTMC-2 en medio con contenido de R3Mab o un anticuerpo control en presencia de 25 ng/ml de FGF9 y 5 ug/ml de heparina o heparina sola (Sin FGF9). Al cabo de 6 días de incubación, se agregó [³H]-timidina durante 16 h de incubación. Se normalizaron los datos a los de las células cultivadas en ausencia de FGF9 y anticuerpo. (B-C) Efecto de

R3Mab sobre la incorporación de [^3H]-timidina por las células OPM2 (B) y KMS11 (C). Se cultivaron las células en medio FBS al 1,5% con R3Mab o un anticuerpo control durante 6 días. Se normalizaron los datos a los de las células sin tratamiento. Las barras de error representan el SEM.

FIGURA 23: Niveles de expresión de FGFR3 en la superficie celular en células de mieloma y cáncer de vejiga. (A) Expresión de FGFR3 en la superficie celular en células de mieloma y cáncer de vejiga evaluada mediante análisis FACS. Se colorearon las células con mAb de ratón conjugado a ficoeritina contra el FGFR3 humano (FAB766P, R&D Systems) o el isotipo IgG1 de ratón control conjugado a ficoeritina (BD Pharmingen). (B) Análisis de Scatchard de la densidad de FGFR3 en células de mieloma y células de cáncer de vejiga. Se radioyodó el R3Mab y se lo incubó con células en suspensión con exceso de anticuerpo sin marcar. Después de la incubación a TA por espacio de 2 horas, las células fueron reducidas a pellets mediante centrifugación y lavadas dos veces. Se determinó el ^{125}I unido específicamente. La densidad del receptor y la afinidad de unión (Kd) representan la media de dos experimentos de unión.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer anticuerpos anti-FGFR3 que son de utilidad, por ej., para el tratamiento o prevención de estados de enfermedad asociados con la expresión y/o actividad de FGFR3, tal como expresión y/o actividad incrementada o expresión y/o actividad perjudicial. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo de las células.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-FGFR3 de la invención son de utilidad como reactivos para la detección y/o aislamiento de FGFR3, como por ejemplo la detección de FGFR3 en diversos tipos de tejidos y células.

La invención presenta además métodos para la preparación y uso de anticuerpos anti-FGFR3 y polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-FGFR3.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descriptos o mencionados en la presente son generalmente conocidas y de utilizados habitualmente con la metodología convencional por las personas con capacitación en la técnica, como por ejemplo las metodología de uso generalizado descriptas por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3a. edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Banda, eds. (1988) ANTICUERPOS, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

(a) Un anticuerpo "aislado" es aquél que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo es purificado (1) a más de 95% en peso del anticuerpo según determinación por el método de Lowry y muy preferentemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de tazón giratorio o, o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida) en condiciones reductoras o no reductoras empleando azul Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes, ya que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no está presente. Sin embargo, por lo general se prepara el anticuerpo aislado mediante por lo menos un paso de purificación.

Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está asociada comúnmente en el origen natural del ácido nucleico. Una molécula aislada de ácido nucleico no se encuentra en la forma o situación en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula aislada de ácido

nucleico incluye una molécula de ácido nucleico contenida en las células que normalmente expresan el ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo) donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término "numeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "numeración de las posiciones de aminoácidos según Kabat," y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración empleado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos encontrados en el trabajo de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes al acortamiento o a la inserción en la misma de una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir la inserción de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 residuos insertados (por ej. residuos 82a, 82b y 82c, etc, de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. Se puede determinar la numeración de residuos de Kabat correspondiente a un anticuerpo dado alineando las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "standard" numeradas según Kabat.

La frase "sustancialmente similar," o "sustancialmente igual," en el presente contexto, denota un grado de similitud suficientemente elevado entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparativo) de tal manera que una persona con capacitación en la técnica considere que la diferencia entre los dos valores son de poca o ninguna significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ej., valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferentemente inferior a aproximadamente 50%, preferentemente inferior a aproximadamente 40%, preferentemente inferior a aproximadamente 30%, preferentemente inferior a aproximadamente 20%, preferentemente inferior a aproximadamente 10% en función del valor correspondiente al anticuerpo de referencia/ comparativo.

"Afinidad de unión" se refiere, en general, a la potencia de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ej., un anticuerpo) y su asociado en la unión (por ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, en el presente contexto, "afinidad de unión" se refiere a la

afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ej., anticuerpo y el antígeno). La afinidad de una molécula X por su asociado Y puede ser representada generalmente por la constante de disociación (K_d). Convenientemente, la K_d es 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , o incluso 1×10^{-10} o mayor. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad se unen al antígeno generalmente con lentitud y tienden a disociarse fácilmente, en tanto que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno con más rapidez y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede ser utilizado en el marco de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

En una realización, la " K_d " o "valor de K_d " de acuerdo con esta invención se mide mediante un ensayo de unión radiomarcada al antígeno (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe en el siguiente ensayo, que mide la afinidad de unión en solución de los Fabs por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración ínfima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno sin marcar, luego capturando el antígeno unido con una placa revestida con el anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865–881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se revisten placas microtituladoras (Dynex) de un día para otro con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab anticuerpo de captura (Cappel Labs) e carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y seguidamente se lo bloquea con 2% de (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no absorbente (Nunc #269620), se mezcla [^{125}I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ej., consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593–4599). A continuación se incuba el Fab de interés de un día para otro; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más prolongado (por ej., 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ej., durante una hora). Seguidamente se retira la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 μl /pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard) y se realiza el recuento de las placas en un contador gamma Topcount

(Packard) por espacio de diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que den menos o igual a 20% de la unión máxima para usar en los ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, la K_d o valor K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial empleando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips del antígeno inmovilizado CM5 a ~10 de unidades de respuesta (RU). En pocas palabras, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones al doble en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a un caudal volumétrico de aproximadamente 25 µl/min. En algunas realizaciones, se utilizan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmón superficial: se inmoviliza el anticuerpo en chips biosensores CM5 para obtener aproximadamente 400 RU y para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones al doble en serie de la proteína objetivo (por ej., FGFR3-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en buffer PBST a 25°C con un caudal volumétrico de aproximadamente 30 µl/minuto. Se calculan los coeficientes de asociación (k_{on}) y los coeficientes de disociación (k_{off}) empleando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_d) en términos de la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ej., Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865–881. Si el coeficiente de asociación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ según el mencionado ensayo de resonancia de plasmón superficial, luego se determina el coeficiente de asociación utilizando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes del antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con bloqueo de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta roja con agitación.

También se puede determinar el “coeficiente on” o “coeficiente de asociación” o “ k_{on} ” de acuerdo con esta invención con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 con antígeno inmoviliado a ~10 unidades de respuesta (RU). En pocas palabras, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con N-etil-N’- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5µl/minutos para obtener aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones al doble en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. En algunas realizaciones, se utilizan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmón superficial: se inmoviliza el anticuerpo contra los chips biosensores CM5 para obtener aproximadamente 400 RU y para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie al doble de la proteína objetivo (por ej., FGFR3-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en buffer PBST a 25°C con un caudal de aproximadamente 30 µl/minuto. Se calculan los coeficientes de asociación (k_{on}) y los coeficientes de disociación (k_{off}) utilizando un sencillo modelo uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_d) en términos de relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ej., Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865–881. Sin embargo, si el coeficiente de activación es superior a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ según el mencionado ensayo de resonancia de plasmón superficial, el coeficiente de activación se determina preferentemente empleando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o descenso de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm paso de banda) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes del antígeno medidas en un espectrómetro tal como un espectrómetro equipado con bloqueo de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000-series (ThermoSpectronic) con cubeta roja agitadora.

El término "vector," se utiliza en el presente contexto, para referirse a una molécula de ácido nucleico con capacidad para transportar otro ácido nucleico al cual se la ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar más segmentos de ADN al genoma viral. Ciertos vectores tienen la capacidad de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se los introduce (por ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero. Se pueden integrar otros vectores (por ej., vectores no episomales de mamífero) al genoma de una célula huésped ante la introducción en la célula huésped y, de esa manera, se replican junto con el genoma del huésped. Más aun, ciertos vectores tienen la capacidad de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente ligados. En la presente se hace referencia a dichos vectores como "vectores de expresión recombinante"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se presentan en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, se puede utilizar "plásmido" y "vector" en forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente.

"Polinucleótido," o "ácido nucleico," utilizados en la presente en forma intercambiable, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. En caso de estar presente, se puede impartir la modificación de la estructura de un nucleótido antes o después del ensamble del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede ser modificado además después de la síntesis, como por ejemplo mediante conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, los "casquetes," la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones entre nucleótidos tales como, por ejemplo, los que tienen ligamientos sin carga (por ej., metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con ligamientos cargados (por ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos

pendientes tales como, por ejemplo, proteínas (por ej., nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, pli-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ej., acridina, psoralen, etc.), los que contienen quelantes (por ej., metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen ligamientos modificados (por ej., ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), como así también formas no modificadas del polinucleótido (o polinucleótidos). Más aun, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares pueden ser reemplazados, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores standard standard, o activados para preparar ligamientos adicionales a nucleótidos adicionales, o se los puede conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede ser fosforilado o sustituido con aminas o restos de grupos de casquete de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden obtener otros hidroxilos para grupos protectores standard. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o deoxiribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcar alfa-anomérico, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Se puede reemplazar uno o más ligamientos de fosfodiéster por grupos ligantes alternativos. Estos grupos de ligamiento alternativos incluyen, aunque no a título de limitación, las realizaciones en las que se reemplaza el fosfato por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)O', CO o CH₂ ("formacetal"), en el cual cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que opcionalmente contiene un ligamiento (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los ligamientos de un polinucleótido sean idénticos. La descripción que antecede se aplica a todos los polinucleótidos a que se hace referencia en la presente, incluyendo ARN y ADN.

"Oligonucleótido," en el presente contexto, se refiere generalmente, en pocas palabras, a polinucleótidos monocatenarios, generalmente sintéticos que por lo general, aunque no necesariamente, tienen una longitud inferior a aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior correspondiente a polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptido o polipéptido se define en términos del porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos de la secuencia peptídica o polipeptídica específica, una vez alineadas las secuencias e introducidas las brechas, en caso de ser necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencias y sin considerar las posibles sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede obtener de diversas maneras que son de conocimiento de los técnicos, por ejemplo utilizando software de computación disponible para el público tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Las personas con capacitación en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo que sea necesario para obtener un alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se están comparando. En el marco de la presente, sin embargo, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2, y se presenta un código fuente completo para el programa ALIGN-2 en la Tabla A expuesta a continuación. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc. y el código fuente fue presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde se lo ha registrado bajo el No. de Registro de Derechos de autor No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se lo puede compilar a partir del código fuente provisto, por ejemplo, en WO2007/001851. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para usar en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B y donde Y es el número total de residuos aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con B no es igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con A.

En algunas realizaciones, dos o más secuencias de aminoácidos son por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% idénticas. En algunas realizaciones, dos o más secuencias de aminoácidos son por lo menos 95%, 97%, 98%, 99%, o incluso 100% idénticas. A menos que específicamente se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos empleados en la presente se obtienen de acuerdo con lo descrito en el párrafo inmediatamente precedente utilizando el programa de computación ALIGN-2.

El término "FGFR3" se refiere, en el presente contexto, a menos que se indique específicamente o en el contexto lo contrario, a cualquier polipéptido de FGFR3 natural o variante (ya sea natural o sintético) (por ej., la isoforma FGFR3-IIIb o la isoforma FGFR3-IIIc). El término "secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas de origen natural (por ej., una secuencia de dominio extracelular o una secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes de origen natural (por ej., formas de empalme alternativas) y variantes alélicas de origen natural. El término "FGFR3 de tipo salvaje" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína FGFR3 de origen natural. El término "secuencia de FGFR3 de tipo salvaje" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos encontrada en un FGFR3 de origen natural.

El término "ligando de FGFR3," (denominado, en forma intercambiable "FGF") se refiere, en el presente contexto, y a menos que específicamente se indique o que el contexto indique lo contrario, a cualquier ligando de FGFR3 nativo o variante (ya sea natural o sintético) (por ejemplo, un polipéptido FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17, FGF18, FGF23). El término "secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas de origen natural (por ej., una secuencia de dominio extracelular o secuencia de subunidad transmembrana), formas variantes

de origen natural (por ej., formas de empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural. El término "ligando de FGFR3 de tipo salvaje" se refiere generalmente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína ligando de FGFR3 de origen natural. El término "secuencia ligando de FGFR3 de tipo salvaje" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en un ligando FGFR3 de origen natural.

"Activación de FGFR3" se refiere a la activación, o fosforilación, del receptor FGFR3. Generalmente, la activación de FGFR3 da lugar a la transducción de señal (por ej. la causada por un dominio de quinasa intracelular de residuos de tirosina que fosforilan el receptor FGFR3 en FGFR3 o un polipéptido sustrato). La activación de FGFR3 puede ser mediada por la unión del ligando FGFR que se une al receptor FGFR3 de interés. La unión del ligando FGFR3 (por ej., tal como FGF1 o FGF9) al FGFR3 puede activar un dominio de quinasa de FGFR3 y de esa manera da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina en FGFR3 y/o fosforilación de residuos de tirosina en otro polipéptido (o polipéptidos) adicional(es).

(b) El término "constitutivo" en el presente contexto, como por ejemplo en lo que respecta a la actividad de quinasa del receptor, se refiere a la actividad de señalización continua de un receptor que no depende de la presencia de un ligando u otras moléculas activadoras. Dependiendo de la naturaleza del receptor, toda la actividad puede ser constitutiva o la actividad del receptor puede ser activada a su vez por la unión de otras moléculas (por ej., ligandos). Los eventos celulares que llevan a la activación de los receptores son conocidas entre las personas con capacitación normal en la técnica. Por ejemplo, la activación puede incluir oligómeroización, por ej., dimerización, trimerización, etc., para formar complejos receptores de más alto orden. Los complejos pueden comprender una sola especie de proteína, es decir, un complejo homomérico. Por otro lado, los complejos pueden comprender por lo menos dos especies de proteínas diferentes, es decir, un complejo heteromérico. La formación de complejos puede ser causado, por ejemplo, por la sobreexpresión de formas normales o mutantes del receptor en la superficie de una célula. La formación de complejos también puede ser causada por una mutación o mutaciones específicas en un receptor.

(c) El término "independiente de ligandos" en el presente contexto, por ejemplo en lo que respecta a la actividad de señalización del receptor, se refiere a la actividad de señalización que no depende de la presencia de un. Un receptor

que tiene actividad de quinasa independiente de ligandos no excluye necesariamente la unión del ligando a ese receptor para producir una activación adicional de la actividad de quinasa.

(d) El término "dependiente de ligandos" se refiere, en el presente contexto, por en lo que se aplica a la actividad de señalización del receptor, se refiere a la actividad de señalización que depende de la presencia de un ligando.

(e) La frase "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular específica. Con frecuencia se hace referencia a la región duplicada (un tramo del ADN amplificado) como "amplicón". Habitualmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en la proporción del número de copias realizadas del gen específico expresado.

(f) Un "inhibidor de la tirosina quinasa" es una molécula que inhibe en alguna medida la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor FGFR3.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe expresión, amplificación o activación de FGFR3" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, expresa (inclusive sobreexpresa) FGFR3, tiene gen FGFR3 amplificado y/o de otro modo demuestra la activación o fosforilación de un FGFR3.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe Activación de FGFR3" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra la activación o fosforilación de FGFR3. Dicha activación se puede determinar directamente (por ej. midiendo la fosforilación del FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe activación constitutiva del FGFR3" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra la activación o fosforilación constitutiva de un FGFR3. Dicha activación se puede determinar directamente (por ej. midiendo la fosforilación del FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe amplificación del FGFR3" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, tiene un gen FGFR3 amplificado.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe Traslocación del FGFR3" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, tiene un gen FGFR3 traslocado. Un ejemplo de traslocación del FGFR3 es la traslocación t(4;14), que tiene lugar en algunos tumores de mieloma múltiple.

Un ensayo "fosfo-ELISA" es, en este contexto, un ensayo en el cual se evalúa la fosforilación de uno o más FGFR3, sustrato o moléculas de

señalización posterior en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) empleando un reactivo, por lo general un anticuerpo, para detectar un FGFR3, sustrato o molécula de señalización posterior fosforilado. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo que detecta FGFR3 o pMAPK fosforilado. El ensayo se puede realizar en lisados celulares, preferentemente con muestra biológicas frescas o congeladas.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe activación de FGFR3 independiente de ligandos" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación independiente de ligandos o fosforilación de un FGFR3. Dicha activación se puede determinar directamente (por ej. midiendo la fosforilación del FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe activación de FGFR3 dependiente de ligandos" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación dependiente de ligandos o fosforilación de a FGFR3. Dicha activación se puede determinar directamente (por ej. midiendo la fosforilación del FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una muestra de cáncer o biológica que "exhibe activación de FGFR3 independiente de ligandos" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra independiente de ligandos activación o fosforilación de a FGFR3. Dicha activación se puede determinar directamente (por ej. midiendo la fosforilación del FGFR3 mediante ELISA) o indirectamente.

Una célula cancerosa con "sobreeexpresión o amplificación de FGFR3" es aquella que tiene niveles significativamente más elevados de una proteína o gen FGFR3 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreeexpresión puede ser causada por amplificación génica o por un incremento de la transcripción o traducción. La sobreeexpresión o amplificación de FGFR3 se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles incrementados de la proteína FGFR3 presente n la superficie de una célula (por ej. mediante un ensayo de inmunohistoquímica, IHC). Por otro lado, o además, se pueden medir los niveles del ácido nucleico codificador de FGFR3 en la célula, por ej. mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre de 1998), southern blotting o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Aparte de los ensayos mencionados, el técnico capacitado dispone de diversos ensayos in vivo. Por ejemplo, se puede exponer a las células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un

marcador detectable, por ej. un isótopo radiactivo y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células del paciente, por ej. mediante exploración externa para detectar la radiactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada del paciente previamente expuesto al anticuerpo.

(g) El término “mutación”, en el presente contexto, se refiere a una diferencia en la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de la proteína o ácido nucleico específico (gen, ARN) con respecto a la proteína o ácido nucleico de tipo salvaje, respectivamente. Una proteína o ácido nucleico mutado se puede expresar o encontrar en un alelo (heterocigota) o ambos alelos (homocigotas) de un gen y puede ser somático o de línea germinal. En la presente invención, las mutaciones son generalmente somáticas. Las mutaciones incluyen rearrreglos de secuencias tales como inserciones, deleciones y mutaciones puntuales (incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido/aminoácido).

(h) “Inhibir” es disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia.

(i) Un agente posee “actividad o función agonista” cuando un agente imita por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ej., ligando de FGFR, tal como FGF1 o FGF9).

(j) Un “anticuerpo agonista”, en el presente contexto, es un anticuerpo que imita por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ej., ligando de FGFR, tal como).

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

(l) En el presente contexto, una muestra o célula que “expresa” una proteína de interés (tal como un receptor FGF o ligando del receptor FGF) es aquella en la cual se determina que el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, incluyendo fragmentos de la misma, está presente en la muestra o célula.

(m) Un “inmunoconjugado” (al que se hace referencia, en forma intercambiable, como “conjugado anticuerpo–droga” o “ADC”) se refiere a un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, como por ejemplo un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ej., una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El término "Región Fc", en el presente contexto, se refiere en general a un complejo dimérico que comprende las secuencias polipeptídicas C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, donde la secuencia del polipéptido C-terminal es aquella que se puede obtener mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La Región Fc puede comprender secuencias Fc nativas o variantes. Si bien los límites de la secuencia Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podría variar, la secuencia de Fc de cadena pesada de la IgG humana se extiende, como se define habitualmente, desde un residuo aminoácido aproximadamente en la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el término carboxilo de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3 y opcionalmente comprende un dominio CH4. Se puede suprimir la lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. En consecuencia, una composición que comprende un anticuerpo que presenta una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender un anticuerpo con K447, donde se ha suprimido la totalidad de K447, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

En el presente contexto "polipéptido Fc" se refiere a uno de los polipéptidos que constituyen una Región Fc. Un polipéptido Fc puede ser obtenido de cualquier inmunoglobulina adecuada tal como los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunas realizaciones, un polipéptido Fc comprende parte o la totalidad de una secuencia de región bisagra (generalmente en su término N). En algunas realizaciones, un polipéptido Fc no comprende una secuencia de región bisagra funcional o de tipo salvaje.

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

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado a una molécula heteróloga, como por ejemplo un resto o radiomarcador citotóxico.

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

Para el análisis de selección de anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede ejecutar un análisis de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Banda (1988).

Para incrementar la vida media de los anticuerpos o polipéptidos que contiene las secuencias de aminoácidos de la presente invención, se puede anexar un epítipo de rescate que se une al receptor (especialmente un fragmento de anticuerpo), de acuerdo con lo descrito, por ej., en la Patente de Estados Unidos 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de rescate de unión al receptor puede estar ligada en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido de la presente invención por lo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico modificada comprende el epítipo de rescate de unión al receptor y una secuencia polipeptídica de la presente invención. En el presente contexto, el término "epítipo de rescate de unión al receptor" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del aumento de la vida media sérica in vivo de la molécula de IgG (por ej., Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739–766 (2000), Tabla 1). Los anticuerpos con sustituciones en una Región Fc de los mismos y con vidas medias incrementadas en suero también fueron descritos en WO00/42072, WO 02/060919; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591–6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213–6216 (2004)). En otra realización, también se puede incrementar la vida media en suero, por ejemplo, acoplándolo a otras secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden acoplar anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención a albúmina sérica o a una porción de la albúmina sérica que se une al receptor FcRn o a un péptido que se une a la albúmina sérica de manera que la albúmina sérica se una al anticuerpo o polipéptido, por ej., secuencias de polipéptidos que se describen en WO01/45746. En una realización preferida, el péptido de albúmina sérica a acoplar comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGCLW (SEC ID NO: 183). En otra realización, se incrementa la vida media de un Fab por estos métodos. Véase asimismo, Dennis et al. *J. Biol. Chem.* 277:35035–35043 (2002) para encontrar secuencias peptídicas que se unen a la albúmina sérica.

El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más de la longitud total de la molécula

de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

La frase "poca o ninguna función agonista" con respecto a un anticuerpo de la invención, en el presente contexto, significa que el anticuerpo no provoca una cantidad biológicamente significativa de actividad agonista, por ej., tras la administración a un sujeto. Como es de conocimiento en la técnica, la cantidad de una actividad se puede determinar en forma cuantitativa o cualitativa, siempre que se puede efectuar la comparación entre un anticuerpo de la invención y una contraparte de referencia. La actividad se puede medir o detectar de acuerdo con un ensayo o técnica conocida en el arte, incluyendo, por ej., una de las descritas en la presente. La cantidad de una actividad correspondiente a un anticuerpo de la invención y su contraparte de referencia se puede determinar en corridas paralelas o separadas. En algunas realizaciones, un anticuerpo bivalente de la invención no posee función agonista sustancial.

Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de muerte celular en los mamíferos, que por lo general va acompañada por uno o más cambios de características de las células, incluyendo la condensación del citoplasma, la pérdida de microvellosidades de la membrana plasmática, la segmentación del núcleo, la degradación del ADN cromosómico o la pérdida de función mitocondrial. La actividad se puede determinar y medir empleando técnicas conocidas en el medio, por ejemplo mediante ensayos de viabilidad de las células, análisis FACS o electroforesis de ADN y, más específicamente, la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, el encogimiento de las células, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación de las células y/o la formación de vesículas en la membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan en forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ej., anticuerpos monoclonales de longitud total o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ej., anticuerpos biespecíficos siempre que exhiban la actividad biológica pretendida) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe más adelante en forma más detallada). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con afinidad madurada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en cuanto a la secuencia entre anticuerpos y se los utiliza en la unión y la especificidad de cada anticuerpo específico por su antígeno específico. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme por la totalidad de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena liviana como de cadena pesada. Las porciones más altamente concentradas de los dominios variables se denominan marco (FR). Cada uno de los dominios variables de cadena pesada y liviana naturales comprende cuatro regiones FR, que en gran parte adoptan una configuración de láminas β , conectadas por tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de láminas β . Las CDRs de cada cadena son mantenidas juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben diversas funciones efectoras, como por ejemplo la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión al antígeno y de todas maneras tiene la capacidad de entrecruzarse con el antígeno.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. En una especie de Fv bicatenario, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana en íntima asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenario, puede haber un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena liviana ligados en forma covalente por un ligante peptídico flexible de tal manera que las cadenas liviana y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de

unión al antígeno en la superficie del dímero VH–VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene asimismo el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los Fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'–SH es la designación en la presente que se da al Fab' en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes acarrear un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ fueron producidos originalmente en forma de pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas livianas” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser categorizadas en diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, donde la porción conserva preferentemente por lo menos una, preferentemente la mayoría o todas las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de anticuerpos. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por consiguiente, mantiene la capacidad de unirse al

antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo aquel que comprende la Región Fc, retiene por lo menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como por ejemplo la unión a FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función de ADCC y la unión a complementos. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ej., dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno ligado a una secuencia Fc con capacidad para conferir estabilidad in vivo al fragmento.

El término “región hipervariable,” “HVR,” o “HV,” utilizado en el presente contexto se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo con secuencia hipervariable y/o que forma bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Hay un número de determinaciones de región hipervariable en la práctica, que están abarcadas en la presente. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad de Kabat (CDRs) se basan en la variabilidad de secuencia y son las utilizadas más comúnmente (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, por su parte, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901–917 (1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un trueque entre las CDRs de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se las utiliza en el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables “de contacto” se basan en el análisis de las estructuras cristalinas de los complejos disponibles. A continuación se consignan los residuos de cada una de estas regiones hipervariables.

	Lazo Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	—————	———	—————	—————
L1	L24–L34	L24–L34	L26–L32	L30–L36
L2	L50–L56	L50–L56	L50–L52	L46–L55
L3	L89–L97	L89–L97	L91–L96	L89–L96
H1	H31–H35B	H26–H35B	H26–H32	H30–H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31–H35	H26–H35	H26–H32	H30–H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50–H65	H50–H58	H53–H55	H47–H58

H3 H95–H102 H95–H102 H96–H101 H93–H101

Las Regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas”, a saber: 24–36 o 24–34 (L1), 46–56 o 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en la VL y 26–35 (H1), 50–65 o 49–65 (H2) y 93–102, 94–102 o 95–102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable están numerados de acuerdo con Kabat et al., antes citado, por cada una de estas definiciones.

Los residuos “Marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos de las regiones hipervariables según lo definido en la presente.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ej., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor han sido reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano con la necesaria especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, se reemplazan los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana por los correspondientes residuos no humanos. Más aun, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar aun más la eficiencia del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente la totalidad de las FRs de las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, referirse a Jones et al., *Nature* 321:522–525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323–329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593–596 (1992). Véase asimismo los siguientes artículos de reseña y las referencias citadas en la presente: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105–115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035–1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428–433 (1994).

Los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o liviana idéntica u homóloga de las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase, como así también fragmentos de esos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica conveniente (Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855 (1984)). Un anticuerpo humanizado es, en el presente contexto, una subserie de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpos “Fv de cadena simple” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Por lo general, el polipéptido scFv comprende además un ligante polipeptídico entre los dominios VH y VL, que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para ver una reseña de scFv remitirse a Pluckthun, en *The Pharmacology of Anticuerpos monoclonales*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269–315 (1994).

Un “antígeno” es un antígeno predeterminado al cual se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno objetivo puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. Preferentemente, el antígeno objetivo es un polipéptido.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena del polipéptido (VH – VL). Utilizando un ligando que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y generar dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo en EP 404,097; WO 93/11161 y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444–6448 (1993).

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde al de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido creado utilizando cualquiera de las técnicas para la creación de anticuerpos humanos descriptas en la presente. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un anticuerpo "con afinidad madurada" es aquel que tiene una o más alteraciones en una o más CDRs del mismo, que den lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee esa alteración (o alteraciones). Los anticuerpos con afinidad madurada preferidos tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno objetivo. Los anticuerpos con afinidad madurada son producidos por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779–783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante transposición (shuffling) de los dominios VH y VL. Se describe la mutagénesis al azar de CDR y/o residuos marco en las obras de: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809–3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147–155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994–2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310–9 (1995) y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889–896 (1992).

La expresión "funciones efectoras" de un anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la Región Fc (una Región Fc de secuencia nativa o Región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo y varían con el isotipo de anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo se incluyen: la unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión del Fc al receptor; citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación a menos de los receptores de la superficie celular (por ej., receptor de células B) y activación de células B.

"Citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a los receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ej., células Killer (estructuras) Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo que acarrea el antígeno y seguidamente destruyen la célula objetivo con las citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente indispensables para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas está resumida en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457–92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede ejecutar un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.500.362 o 5.821.337 o Presta, Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056. Las células efectoras ventajosas para esos ensayos

incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Killer Naturales (NK). Por otro lado, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada in vivo, por ej., en un modelo animal tal como el descrito por Clynes et al., PNAS (USA) 95:652–656 (1998).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan una o más FcRs y cumplen funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y cumplen la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células Killer Naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, siendo preferidas las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente natural, por ejemplo de la sangre.

Un “receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la Región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aun, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren fundamentalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor con base de tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor con base de tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase la reseña de M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203–234 (1997)). Los FcRs fueron reseñados por Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457–92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25–34 (1994) y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330–41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se van a identificar en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en la presente. El término incluye asimismo el receptor neonatal, FcRn, que es responsable por la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas. WO 00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcRs. El contenido de esa publicación de patente se incorpora específicamente a la presente como referencia. Ver, asimismo, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591–6604 (2001).

Los métodos para medir la unión a FcRn son conocidos (véase, por ej., Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano in vivo y la vida media en suero de los polipéptidos de unión al FcRn humano con alta afinidad pueden ser analizados, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos Fc variantes.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno correspondiente. Para evaluar la activación del complemento, se puede ejecutar un ensayo, por ej., el descrito por Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Métodos* 202:163 (1996).

Las variantes de polipéptido con secuencia de aminoácidos alterada de la Región Fc y capacidad de unión al C1q incrementada o reducida han sido descritas en la Patente de Estados Unidos No. 6.194.551B1 y WO 99/51642. El contenido de esas publicaciones de patente se incorpora específicamente a la presente como referencia. Ver, además, Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178–4184 (2000).

El término "polipéptido que comprende la Región Fc" se refiere a un polipéptido, como por ejemplo un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una Región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de la EU) de la Región Fc se puede suprimir, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende un polipéptido que tiene una Región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender polipéptidos con K447, donde se ha suprimido todo el K447, o una mezcla de polipéptidos con y sin residuos K447.

Un "marco aceptor humano" es, en el presente contexto, un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de VL o VH derivado de un marco de inmunoglobulina humana, o de un marco de consenso humano. Un marco aceptor humano "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de aquella, o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En caso de haber cambios preexistentes de aminoácidos, no ha de haber más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos cambios

preexistentes de aminoácidos. Cuando los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en un VH, preferentemente esos cambios están en sólo tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T, y/o 78A. En una realización, el marco aceptor humano VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana VL o la secuencia marco de consenso humano.

Un “marco de consenso humano” es un marco que representa el marco de residuos aminoácidos que representa el residuo aminoácido de aparición más común en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias VL o VH humanas es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo según Kabat et al. En una realización, en el caso de VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I según Kabat et al. En una realización, en el caso de VH, el subgrupo es el subgrupo III según Kabat et al.

Un “marco de consenso de subgrupo III de VH” comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso de subgrupo III de VH comprende por lo menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID NO: 184)–H1–
WVRQAPGKGLEWV (SEC ID NO: 185)–H2–
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID NO: 186)–H3–
WGQGTLVTVSS (SEC ID NO: 187).

“marco de consenso de subgrupo I de VL” comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo Kappa I liviano variable de Kabat et al. En una realización, la secuencia de aminoácidos del marco de consenso de subgrupo I de VH comprende por lo menos una porción o la totalidad de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID NO: 188)–L1–
WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID NO: 189)–L2–
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID NO: 190)–L3–
FGQGTKVEIK (SEC ID NO: 191).

En el presente contexto, “mutante de anticuerpo” o “variante de anticuerpo” se refiere a una secuencia de aminoácidos variante de un anticuerpo en la cual se ha modificado uno o más de los residuos aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie. Dichos mutantes tienen necesariamente menos de 100% de

identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, el anticuerpo mutante tiene una secuencia de aminoácidos con por lo menos 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada liviana del anticuerpo dependiente de la especie, más preferentemente por lo menos 80%, más preferentemente por lo menos 85%, más preferentemente por lo menos 90% y muy preferentemente por lo menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente como porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir un residuo aminoácido del mismo grupo sobre la base de las propiedades comunes de la cadena secundaria, ver más adelante) con los residuos del anticuerpo dependiente de la especie, después de alinear las secuencias e introducir brechas, en caso de ser necesario, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se debe considerar que ninguna de las extensiones N-terminales, C-terminales o internas deleciones o inserciones en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable afecta la identidad o similitud de secuencias.

Un "trastorno" o "enfermedad" es cualquier condición que se pueda afectar ventajosamente con el tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas entre las que se incluyen las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente se incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico o a medidas preventivas. Los que necesitan dicho tratamiento incluyen los que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastático, como así también aquellos en los cuales se debe prevenir la aparición o recurrencia del cáncer.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico puede reducir el número células cancerosas; reduce el tamaño de los tumores primarios, inhibe (es decir, retarda en alguna medida y preferentemente detiene) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, inhibe (es decir, retarda en alguna medida y preferentemente detiene) las metástasis tumorales; inhibe en alguna medida, el desarrollo de tumores y/o alivia, en alguna medida, uno o más de los síntomas asociados al trastorno. El

grado en que la droga puede prevenir el desarrollo y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En el caso de la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia in vivo, por ejemplo, evaluando la duración de la sobrevida, el tiempo transcurrido hasta el avance de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento descontrolado de las células. Se incluyen en esta definición los cánceres benignos y malignos. La expresión “cáncer en etapa temprana” o “tumor en etapa temprana” se refiere a un cáncer que no es invasivo ni metastático o se clasifica como cáncer en Estadío 0, I o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque no a título de limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o malignidades linfoides. Entre los ejemplos más específicos de esos cánceres se incluye el cáncer de células escamosas (por ej. cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer mamario (incluyendo cáncer mamario metastático), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, cáncer testicular, cáncer de esófago, tumores de las vías biliares, como así también el cáncer de cabeza y cuello y mieloma múltiple.

El término “precanceroso” se refiere a una condición o excrescencia que por lo general precede al cáncer o se desarrolla hasta serlo. Una excrescencia precancerosa tiene células que se caracterizan por la regulación, proliferación o diferenciación anormal del ciclo celular, lo que se puede determinar mediante

marcadores de la regulación del ciclo celular, la proliferación o la diferenciación celular.

El término “displasia” se refiere a cualquier crecimiento o desarrollo anormal de un tejido, órgano o célula. Preferentemente, la displasia es de alto grado o precancerosa.

El término “metástasis” se refiere a la propagación del cáncer de su sitio primario a otros puntos del cuerpo. Las células cancerosas se pueden desprender de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular por el torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metastizar) en los tejidos normales en otras partes del cuerpo. Las metástasis pueden ser locales o distantes. La metástasis es un proceso sucesivo, supeditado al desprendimiento de las células tumorales del tumor primario, que se desplazan por el torrente sanguíneo y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un abastecimiento de sangre y pueden desarrollarse hasta formar una masa potencialmente letal.

Tanto las vías estimulatorias como inhibitorias dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento y las interacciones entre las células tumorales y las células huésped en el sitio distante también son significativos.

La expresión “no metastático” se refiere a un cáncer que es benigno o que se mantiene en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema linfático o los vasos sanguíneos o a tejidos que no sean los del sitio primario. Por lo general, un cáncer no metastático es cualquier cáncer que se encuentra en el Estadio 0, I, o II y ocasionalmente un cáncer en Estadio III.

La expresión “tumor primario” o “cáncer primario” se refiere al cáncer original y no a una lesión metastática situada en otro tejido, órgano o localización en el cuerpo del sujeto.

La expresión “tumor benigno” o “cáncer benigno” se refiere a un tumor que se mantiene localizado en el sitio de origen y no tiene la capacidad de infiltrarse, invadir o metastizar a un sitio distante.

La expresión “carga tumoral” se refiere al número de células cancerosas, al tamaño de un tumor, o a la cantidad de cáncer en el cuerpo. También se hace referencia a la carga tumoral como carga de tumores.

La expresión “número de tumores” se refiere al número de tumores.

La expresión “sujeto” se refiere a un mamífero, incluyendo aunque no a título de limitación, un mamífero humano o no humano tal como bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un humano.

El término "terapia anticancerosa" se refiere a una terapia que sirve para tratar el cáncer. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos se cuentan, aunque no a título de limitación, por ej., agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en terapia radiante, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina y otros agentes para el tratamiento del cáncer, en algunas realizaciones, anticuerpos anti-CD20, inhibidores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (por ej., Gleevec™ (Imatinib Mesilato)), un inhibidor de la COX-2 (por ej., celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ej., anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los siguientes blancos: receptor o receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. En la presente invención también se incluyen combinaciones de los mencionados.

El término "agente citotóxico" en el presente contexto se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ej., I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas con actividad enzimática de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico ventajoso para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bullatacinona); una camptotequina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (especialmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterine, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales

como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omegal1 (véase, por ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183–186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; como así también neocarzinostatina cromóforo y antibióticos cromóforos relacionados de cormoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatin, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podoilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, O); razoxane; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ej., TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremóforo, formulación de nanopartículas modificadas

con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône– Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucil; GEMZAR® gemcitabina; 6–tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP–16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT–11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecano con 5–FU y leucovorin); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; VELCADE bortezomib; REVLIMID lenalidomide; leucovorin (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC–alfa, Raf, H–Ras, EGFR (por ej., erlotinib (Tarceva™)) y del VEGF–A que reducen la proliferación celular o las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los citados.

También están incluidos en esta definición los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas sobre los tumores tales como antiestrógenos o moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4–hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ketoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON· toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, como por ejemplo, 4(5)–imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestane, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol y ARIMIDEX® anastrozol y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; como así también troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina de 1,3–dioxolano); oligonucleótidos antisentido, especialmente lo que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación aberrante de las células, como por ejemplo, PKC–alfa, Raf y H–Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión del VEGF (por ej., ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, como por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL–2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (ver la patente de los Estados Unidos No. 4.675.187) y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los citados.

El término "prodroga" utilizado en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos tóxica para las células tumorales en comparación con la droga progenitora y tiene la capacidad de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma más activa de la progenitora. Véase, por ej., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375–382, 615a Reunión en Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247–267, Human Press (1985). Las prodrogas de la presente invención incluyen, aunque no a título de limitación, prodrogas con contenido de fosfato, prodrogas con contenido de tiofosfato, prodrogas con contenido de sulfato, prodrogas con contenido péptidos, prodrogas modificadas con D-aminoácidos, prodrogas glucosiladas, prodrogas con contenido de β -lactama, prodrogas con contenido de fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o prodrogas con contenido de fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otras prodrogas de 5-fluorouridina que se pueden convertir a la droga libre citotóxica más activa. Entre los ejemplos de drogas citotóxicas que se pueden procesar para obtener una forma de prodroga para usar en la presente invención se incluyen, aunque no a título de limitación, los agentes quimioterapéuticos antes descriptos.

La expresión "terapia radiante" se refiere al uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir un daño suficiente a la célula para limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir por completo la célula. Se apreciará que hay muchas maneras conocidas en la técnica para determinar el dosaje y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se administran como administración única y las dosis típicas oscilan entre 10 y 200 unidades (Grays) por día.

Una "muestra biológica" (que se denomina en forma intercambiable "muestra" o "muestra de tejido o células") abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo y que se puede utilizar en un ensayo de diagnóstico o monitoreo. La definición abarca sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos tales como un espécimen de biopsia o cultivos tisulares o células derivadas de los mismos y la progenie de las mismas. La definición incluye además las muestras que han sido manipuladas de cualquier manera después de su extracción, como por ejemplo mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes tales como proteínas o polinucleótidos, o mediante incrustación en una matriz semisólida o

sólida con fines de seccionamiento. El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejidos. El origen de la muestra biológica puede ser un tejido sólido como por ejemplo de una muestra o biopsia o aspirado de órganos o tejidos frescos, congelados y/o preservados; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como fluido cerebroespinal; fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial, células de cualquier etapa de la gestación o desarrollo del individuo. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastático. La muestra biológica puede contener compuestos que no están naturalmente entremezclados con el tejido en la naturaleza, como por ejemplo conservantes, anticoagulantes, buffers, fijadores, nutrientes, antibióticos, o similares.

En el presente contexto "sección" de una muestra de tejido se refiere a una sola parte o pieza de una muestra de tejido, por ej., un corte delgado de tejido o células cortadas de una muestra de tejidos. Se entiende que se pueden tomar múltiples secciones de las muestras de tejidos y someterlas a análisis de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, se analiza la misma sección de la muestra de tejidos en los niveles morfológico y molecular, o se la analiza con respecto tanto a la proteína como al ácido nucleico.

El término "marcador" utilizado en el presente contexto se refiere a un compuesto o composición que está conjugado o fusionado directa o indirectamente a un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al cual está conjugado o fusionado. El marcador puede ser detectable en sí (por ej., marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable.

Composiciones de la invención y métodos para su preparación y uso

Esta invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-FGFR3 y polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican un anticuerpo anti-FGFR3. En el presente contexto, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen al FGFR3, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden las secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen al FGFR3. Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados tales como excipientes

farmacéuticamente aceptables que incluyen buffers, que son muy conocidos en la técnica.

La invención abarca asimismo realizaciones de anticuerpos y polinucleótidos aislados.

La invención abarca asimismo el método para tratar un trastorno, por ej. mieloma múltiple o carcinoma en etapa transicional (por ej., carcinoma invasivo en etapa transicional) utilizando un anticuerpo anti-FGFR3 (descrito en la presente o conocido en la técnica).

Composiciones

Los anticuerpos anti-FGFR3 de la invención son preferentemente monoclonales. También están abarcados dentro del alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-FGFR3 aquí presentados. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden generar mediante medios tradicionales tales como digestión enzimática, o se los puede generar mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son de utilidad para los fines de diagnóstico y terapéuticos expuestos a continuación.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por las mutaciones posibles de origen natural que puedan estar presentes en cantidades ínfimas. Por consiguiente, el adjetivo "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es el de una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales anti-FGFR3 de la invención se pueden preparar utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o se los puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster, para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Se pueden generar anticuerpos para FGFR3 en animales por medio de múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de FGFR3 y un adyuvante. El FGFR3 se puede preparar utilizando métodos muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en la presente. Por ejemplo, a continuación se describe la producción recombinante de FGFR3 humano y de ratón. En una realización, se inmuniza a

los animales con un FGFR3 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización preferida, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión FGFR3-IgG1. Normalmente se inmuniza a los animales contra conjugados inmunogénicos o derivados de FGFR3 con monofosforil lípido A (MPL)/trehalosa dicrinomicolato (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y se inyecta la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas más tarde se da un refuerzo a los animales. Se extrae sangre de los animales 7 a 14 días después y se analiza el suero para la titulación de anti-FGFR3. Se dan refuerzos a los animales hasta que el título alcanza una meseta.

Por otro lado, se pueden inmunizar linfocitos in vitro. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado tal como polietilen glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59–103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas ha de incluir típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan con eficiencia, sostienen un alto nivel de producción estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA y células SP-2 o X63-Ag8-653 existentes en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Anticuerpo Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual se están desarrollando las células de hibridoma es analizado para detectar la producción de anticuerpos monoclonales

dirigidos contra el FGFR3. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, como por ejemplo radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

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

Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad pretendida, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivarlos por métodos standard (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59–103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el medio D–MEM o RPMI–1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar in vivo como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados adecuadamente del medio de cultivo, el fluido de ascitis o el suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A–Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos anti–FGFR3 de la invención se pueden preparar empleando bibliotecas de combinaciones para seleccionar clones sintéticos del anticuerpo con la actividad o actividades pretendidas. En principio, los clones de anticuerpo sintéticos son seleccionados mediante el análisis de detección de bibliotecas de fagos que contienen fagos que exhiben diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de envoltura de fagos. Dichas bibliotecas de fagos son exploradas por cromatografía de afinidad contra el antígeno indicado. Los clones que expresan fragmentos Fv con capacidad para unirse al antígeno pretendido son adsorbidos en el antígeno y de esa manera separados de los clones sin unión de la biblioteca. A continuación se eluyen los anticuerpos anti–FGFR3 de la invención diseñando un procedimiento de selección de antígenos adecuado para seleccionar para el clon de fago de interés después de la construcción de un anticuerpo anti–FGFR3 de longitud total utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de región constante (Fc) adecuadas descritas en la obra de Kabat et al., *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, Quinta Edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado por dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas liviana (VL) y pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Los dominios variables se pueden exhibir funcionalmente en fagos, ya sea en forma de fragmentos Fv de cadena simple (scFv), en los cuales VH y VL están ligando covalentemente por medio de un péptido flexible corto, o en forma de Fragmentos Fab, en los cuales cada uno de ellos está fusionado a un dominio constante e interactúa en forma no covalente, de acuerdo con lo descrito por Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). En el presente contexto, los scFv que codifican clones de fagos y los Fab que codifican clones de fago se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

Se pueden clonar por separado repertorios de genes VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarlos aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que a continuación pueden ser explorados para detectar clones de unión al antígeno de acuerdo con lo descrito por Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas ofrecen anticuerpos de alta afinidad por los anticuerpos para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Por otro lado, se puede clonar el repertorio sin tratamiento para producir una sola fuente de anticuerpos humanos para una amplia gama de auto- y no auto-antígenos sin inmunización alguna, según lo descrito por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden preparar bibliotecas sin tratamiento sintéticamente clonando los segmentos de genes V sin rearreglo de células madre y utilizando cebadores de PCR con contenido de secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 sumamente variables y para lograr el rearreglo in vitro de acuerdo con lo descrito por Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Se utiliza fago filamentoso para exhibir fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína de envoltura menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden exhibir en forma de fragmentos Fv de cadena simple, en los cuales los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ej., de acuerdo con lo descrito por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o en forma de Fragmentos Fab, en los cuales una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la

célula huésped bacteriana donde el ensamble de una estructura Fab–proteína de envoltura se exhibe en la superficie del fago desplazando parte de las proteínas de envoltura de tipo salvaje, por ej., como se describe en la obra de Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133–4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos génicos de anticuerpos se obtienen de células inmunes cosechadas de humanos o animales. Si se desea una biblioteca inclinada a favor de clones anti–FGFR3, se inmuniza al individuo con FGFR3 para generar una respuesta al anticuerpo y se recuperan esplenocitos y/o células B circulantes que no son linfocitos de sangre periférica (PBLs) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpos humanos inclinada a favor de clones anti–FGFR3 generando una respuesta anti–FGFR3 del anticuerpo en ratones transgénicos que acarrean una serie de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema endógeno funcional de producción de anticuerpos) de tal manera que la inmunización con FGFR3 de origen a células B que producen anticuerpos humanos contra FGFR3. Más adelante se describe la generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos.

Se puede obtener el enriquecimiento adicional para poblaciones de células reactivas anti–FGFR3 utilizando un procedimiento de selección adecuado para aislar células B que expresan un anticuerpo unido a la membrana específico para FGFR3, por ej., mediante la separación de células con cromatografía de afinidad de FGFR3 o adsorción de células en el FGFR3 marcados con fluoróforo seguidos por clasificación de células activadas por flujo (FACS).

Por otro lado, el uso de esplenocitos y/o células B u otros PBLs de un donador no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humano o no–humano) en la cual el FGFR3 no es antigénico. En el caso de bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpos in vitro, se cosechan células madre del individuo para obtener ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpos sin rearreglo. Se pueden obtener las células inmunes de interés de una variedad de especies animales tales como especies humana, de ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Se recuperan los ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés

y se los amplifica. En el caso de las bibliotecas de genes VH y VL rearrreglados, se puede obtener el ADN buscado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos y luego ejecutando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL rearrreglados de acuerdo con lo descrito por Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833–3837 (1989), creando así diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V se pueden amplificar del ADNc y ADN genómico con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J de acuerdo con lo descrito por Orlandi et al. (1989) y por Ward et al., *Nature*, 341: 544–546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, también se pueden basar los cebadores inversos en el exón líder, según lo descrito por Jones et al., *Biotechnol.*, 9: 88–89 (1991) y cebadores directos dentro de la región constante según lo descrito por Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728–5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores de acuerdo con lo descrito por Orlandi et al. (1989) o Sastry et al. (1989). Preferentemente, se maximiza la diversidad de la biblioteca utilizando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todos los arreglos de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunes, por ej. según se describe en el método de Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991) o como se describe en el método de Orum et al., *Ácidos nucleicos Res.*, 21: 4491–4498 (1993). Para la clonación del AND amplificado en los vectores de expresión, se pueden introducir raros sitios de restricción dentro del cebador de PCR como identificador en un extremo según lo descrito por Orlandi et al. (1989), o mediante amplificación adicional por PCR con un cebador con identificador de acuerdo con lo descrito por Clackson et al., *Nature*, 352: 624–628 (1991).

Se pueden derivar in vitro repertorios de genes V rearrreglados sintéticamente de segmentos de genes V. Se han clonado y secuenciado la mayoría de los segmentos de genes VH humanos (dado a conocer por Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 776–798 (1992)) y mapeado (dado a conocer por Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3: 88–94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones importantes del bucle H1 y H2) se pueden utilizar para generar repertorios diversos de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencia y longitud diversas de acuerdo con lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). También se pueden

preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencias enfocadas en un bucle H3 largo de una sola longitud de acuerdo con lo descrito por Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457–4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos V κ y V λ humanos (dado a conocer por Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456–1461 (1993)) y se los puede utilizar para preparar repertorios sintéticos de cadena liviana. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un rango de plegamientos VH y VL y longitudes L3 y H3, codifican anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de ADN codificadores de genes V, se pueden reorganizar segmentos de genes V de línea germinal in vitro de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992).

Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes VH y VL juntos de diversas maneras. Se puede crear cada repertorio en diferentes vectores recombinados in vitro, por ej., de acuerdo con lo descrito por Hogrefe et al., *Gene*, 128:119–126 (1993), o in vivo por infección combinatoria, por ej., el sistema loxP descrito por Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265–2266 (1993). La estrategia de recombinación in vivo aprovecha la naturaleza bicatenaria de los Fragmentos Fab para superar el límite de tamaño de las bibliotecas impuesto por la eficiencia de transformación de *E. coli*. Se clonan repertorios VH y VL sin procesamiento por separado, uno en un fagomida y el otro en un vector fago. A continuación se combinan las dos bibliotecas mediante infección de fagos de bacterias con contenido de fagomida de manera que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la biblioteca sólo esté limitado por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación in vivo de manera que los genes VH y VL se recombinen para obtener un solo replicón y se co-empaquen en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas presentan grandes números de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Por otro lado, se pueden clonar los repertorios sucesivamente en el mismo vector, por ej., de acuerdo con lo descrito por Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978–7982 (1991), o ensamblar por PCR y luego clonar, por ej. de acuerdo con lo descrito por Clackson et al., *Nature*, 352: 624–628 (1991). El armado por PCR se puede utilizar asimismo para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena simple (scFv). En otra de las técnicas, se utiliza el “ensamble por PCR en la célula” para combinar genes VH y VL dentro de los linfocitos por PCR y luego

repertorios de clones de genes ligados de acuerdo con lo descrito por Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831–3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin proceso (ya sea naturales o sintéticos) pueden ser de moderada afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), aunque también se puede imitar la maduración de la afinidad in vitro construyendo y reselectionado de bibliotecas secundarias de acuerdo con lo descrito por Winter et al. (1994), obra citada. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones al azar in vitro utilizando polimerasa proclive a errores (descritos por Leung et al., Técnica, 1:11–15 (1989)) en el método de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889–896 (1992) o en el método de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576–3580 (1992). Además, se puede ejecutar la maduración de la afinidad mediante mutación al azar de una o más CDRs, por ej. usando PCR con cebadores que acarrean secuencias al azar que abarcan la CDR de interés, en clones de Fv seleccionados individuales y se seleccionan clones con afinidad más elevada. WO 96/07754 (publicada el 14 de marzo de 1996) describía un método para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina para generar una biblioteca de genes de cadena liviana. Otra estrategia eficaz consiste en recombinar los dominios VH o VL seleccionados por exhibición de fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidos de donadores no inmunizados y seleccionar para mayor afinidad en varias rondas de retransposición de cadenas según lo descrito por Marks et al., Biotechnol., 10:779–783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el rango de 10^{-9} M.

Los ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de FGFR3 son conocidos en la técnica. La secuencia de ácido nucleico que codifica el FGFR3 se puede diseñar empleando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de FGFR3. Como bien se sabe en la técnica, hay dos isoformas fundamentales de empalme de FGFR3, FGFR3 IIIb y FGFR3 IIIc. Las secuencias de FGFR3 son muy conocidas en la técnica y pueden incluir la secuencia de UniProKB/Swiss-Prot número de acceso P22607 (FGFR3 IIIc) o P22607_2 (FGFR3 IIIb). Se han identificado mutaciones de FGFR3 que son muy conocidas en la técnica e incluyen las siguientes mutaciones (con referencia a la secuencia ilustrada en UniProKB/Swiss-Prot número de acceso P22607 (FGFR3 IIIc) o P22607_2 (FGFR3 IIIb):

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

Se pueden preparar ácidos nucleicos que codifican FGFR3 mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque no a título de limitación, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos por Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716–734 (1989), tales como los métodos del triéster, fosfito, fosforamidita y H–fosfonato. En una realización, se utilizan codones preferidos por la célula huésped de expresión en el diseño del ADN que codifica FGFR3. Por otro lado, se puede aislar el ADN que codifica el FGFR3 de una biblioteca genómica o de ADNc.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el FGFR3, la molécula de ADN está operativamente ligada a una secuencia control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, donde la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plásmidos contienen secuencias de replicación y control que se obtienen de especies compatibles con la célula huésped. El vector acarrea por lo general un sitio de replicación, como así también secuencias que codifican proteínas con capacidad para producir la selección fenotípica en las células transformadas. Los vectores adecuados para la expresión en células huésped procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica y en la presente se describen algunos de ellos más detalladamente. Se pueden utilizar organismo eucariotas tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica el FGFR3 está operativamente ligado a una secuencia líder secretoria que da lugar a la secreción del producto de la expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder secretorias incluyen stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuado para usar en la presente la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen et al., *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

Las células huésped son transfectadas y preferentemente transformadas con los vectores de expresión o clonación de la presente invención antes descritos y cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped se exprese o no, en realidad, alguna secuencia codificadora. Una persona con capacitación normal en la técnica conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo precipitación de CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce en general cuando en la célula huésped se presenta cualquier indicación de la operación en este vector. Los métodos de transfección son muy conocidos en la técnica y algunos se describen en la presente con más detalles.

Transformación significa introducir ADN en un organismo de manera que el ADN se pueda replicar, ya sea como elemento extracromosómico o por integración cromosómica. Dependiendo de la célula huésped empleada, la transformación se realiza utilizando técnicas standard apropiadas para esas células. Los métodos de transformación son muy conocidos en la técnica y en la presente se describen algunas de ellas.

Las células huésped procariotas utilizadas para producir el FGFR3 se pueden cultivar de acuerdo con lo descrito en general por Sambrook et al., obra citada.

Las células huésped de mamífero empleadas para producir el FGFR3 se pueden cultivar en una variedad de medios, que son muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la presente.

Las células huésped a las que se hace referencia en esta descripción abarcan células de cultivo in vitro así como células que están dentro de un animal hospedador.

La purificación del FGFR3 se puede realizar utilizando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la presente.

El FGFR3 purificado se puede acoplar a una matriz adecuada tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilato, copolímeros poliacrílico y polimetacrílico, nylon, portadores neutros y iónicos y demás, para usar en la separación por cromatografía de afinidad de clones de exhibición de fagos. El acoplamiento de la proteína FGFR3 a la matriz se puede lograr por los métodos

descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica empleada habitualmente para acoplar ligandos proteicos a matrices de polisacáridos, por ej. agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del portador con haluros de cianógeno y el subsiguiente acoplamiento de las aminas primarias alifáticas o aromáticas del ligando peptídico a la matriz activada.

Por otro lado, se puede utilizar el FGFR3 para revestir los pocillos de las placas de adsorción, expresado en las células huésped fijas a placas de adsorción o utilizado para la selección de células, o conjugado a biotina para la captura con perlas revestidas con estreptavidina, o usado en cualquier otro método conocido en el medio para la exploración de bibliotecas de exhibición de fagos.

Se ponen en contacto las muestras de la biblioteca de fagos con FGFR3 inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de por lo menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, se seleccionan las condiciones, incluyendo pH, potencia iónica, temperatura y demás para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se los eluye con ácido, por ej. de acuerdo con lo descrito por Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978–7982 (1991), o con álcalis, por ej. de acuerdo con lo descrito por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581–597 (1991), o mediante competencia de antígenos de FGFR3, por ej. en un procedimiento similar al método de competencia con el antígeno de Clackson et al., *Nature*, 352: 624–628 (1991). Se pueden enriquecer los fagos 20–1.000 veces en una sola ronda de selección. Más aun, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivo bacteriano y someterlos a más rondas de selección.

La eficiencia de la selección depende de numerosos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y de si múltiples fragmentos de anticuerpos en un solo frasco se pueden conectar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) pueden ser retenidos mediante el uso de lavados cortos, exhibición de fagos multivalentes y alta densidad de revestimiento del antígeno en fase sólida. La elevada densidad no sólo estabiliza el fago por medio de interacciones multivalentes, sino que favorece la reasociación del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y afinidades de unión favorables) se puede promover mediante el uso de lavados largos y exhibición de fagos monovalentes de acuerdo con lo descrito por Bass et al., *Proteins*, 8: 309–314 (1990) y en WO 92/09690 y una baja densidad de revestimiento del antígeno de acuerdo con lo descrito por Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779–783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por el FGFR3. Sin embargo, es probable que la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ej. la realizada en alguna de las técnicas de maduración de la afinidad antes descrita) se origine a numerosos mutantes, la mayoría con unión al antígeno y unos pocos con mayor afinidad. Con la limitación del FGFR3, se podría extraer por competencia el raro fago con alta afinidad. Para retener la totalidad de los mutantes con afinidad más elevada, se pueden incubar los fagos con exceso de FGFR3 biotinilado, aunque con el FGFR3 biotinilado en una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar objetivo para el FGFR3. A continuación se pueden capturar los fagos con alta afinidad de unión mediante perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite la selección de los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con hasta tan sólo una afinidad dos veces mayor de un gran exceso de fagos con menos actividad. Las condiciones empleadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden ajustar para discriminar sobre la base de la cinética de disociación.

Se pueden seleccionar clones de FGFR3 por actividad. En una realización, la invención presenta anticuerpos de FGFR3 que bloquean la unión entre un receptor FGFR3 y su ligando (tal como FGF1 y/o FGF9). Se pueden seleccionar clones de Fv que corresponden a dichos anticuerpos de FGFR3 de la siguiente manera (1) aislando clones de FGFR3 de una biblioteca de fagos de acuerdo con lo descrito anteriormente y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando FGFR3 y una segunda proteína contra la cual se desea la actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-FGFR3 en FGFR3 inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir los posibles clones no deseados que reconocen determinantes de unión a FGFR3 que se superponen o comparten con las determinantes de unión de la segunda proteína y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después del paso (4). Opcionalmente, se pueden enriquecer adicionalmente los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo pretendidas repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en este documento.

Se aísla fácilmente el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados por hibridoma o los clones de Fv por exhibición de fagos de la invención y se lo secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ej., utilizando cebadores oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificadoras de la cadena pesada y liviana de interés del hibridoma o el modelo de ADN fago). Una vez aislado, se puede colocar el ADN en los vectores de expresión, que a continuación son transfectados en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, a fin de obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales buscados en las células huésped recombinantes. Los artículos de reseña sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN codificador del anticuerpo incluyen Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151 (1992).

Se puede combinar el ADN que codifica los clones de Fv de la invención con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o cadena liviana (por ej., las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat et al., obra citada) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o livianas de longitud total o parcial. Se ha de apreciar que se pueden utilizar regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD y IgE y que dichas regiones constantes pueden ser obtenidas de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como la humana) y luego fusionado al ADN de región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias codificadoras para la cadena pesada y/o cadena liviana de longitud total está incluido en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" en el presente contexto. En una realización preferida, se fusiona un clon de Fv derivado de ADN variable humano al ADN de región constante humano para formar una o más secuencias codificadoras para todas las cadenas pesadas y/o livianas de longitud total o parcial.

También se puede modificar el ADN que codifica un anticuerpo anti-FGFR3 derivado de un hibridoma de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificadora para los dominios constantes de cadena pesada y liviana humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ej., según el método de Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). También se puede modificar el ADN que codifica un anticuerpo derivado

de hibridoma clon o fragmento Fv uniendo covalentemente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido no inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clones de Fv o clones de hibridoma de la invención.

Fragmentos de anticuerpos

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpos. En ciertos casos hay ventajas en el uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos enteros. El menor tamaño de los fragmentos da lugar a un clearance más rápido y puede llevar a un mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos eran derivados mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ej., Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107–117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, ahora se pueden producir estos fragmentos directamente por células huésped recombinantes. Se pueden expresar y secretar todos los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv and ScFv en *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados de bibliotecas de fagos de anticuerpos antes descritas. Por otro lado, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplarlos químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163–167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, se pueden aislar fragmentos $F(ab')_2$ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con vida media incrementada in vivo que comprenden residuos de un epítipo de unión al receptor de rescate en la patente de los Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos han de ser evidentes para el técnico capacitado. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv) (véase, por ej., WO 93/16185; patentes de los Estados Unidos Nos. 5.571.894 y 5.587.458). Fv y sFv son la única especie con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes: por consiguiente, son adecuados para la unión no específica reducida durante el uso in vivo. Se pueden construir proteínas de fusión sFv para producir la fusión de una proteína efectora en el término amino o carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo puede ser asimismo un "anticuerpo lineal", por ej., de acuerdo con lo descrito en la patente de los

Estados Unidos No. 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. Diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir en un anticuerpo humanizado uno o más residuos aminoácidos de una fuente que no es humana. Con frecuencia se hace referencia a estos residuos aminoácidos no humanos como residuos "de importación" que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522–525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323–327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534–1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567) en los cuales se ha sustituido menos que un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los cuales se sustituyen algunos residuos de la región hipervariable y, posiblemente, algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto livianos como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es de suma importancia para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método del "mejor ajuste", se analiza para la detección la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor contra la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable. A continuación se admite la secuencia humana que se acerca más a la del roedor como marco humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método utiliza un marco específico derivado de una secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo específico de cadenas liviana o pesada. Se puede utilizar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

También es importante humanizar los anticuerpos con retención de la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para obtener

esta meta, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se pueden obtener comúnmente y son de conocimiento de las personas con capacitación en la técnica. Se dispone de programas de computación que ilustran y exhiben probables estructuras de conformación tridimensional de las secuencias candidatas de inmunoglobulina. La inspección de estos modelos permite el análisis del rol probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esa manera, se pueden seleccionar residuos de FR y combinar con el receptor e importar secuencias a fin de obtener la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo afinidad incrementada por el o los antígenos objetivo. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y muy sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

Se pueden construir anticuerpos humanos anti-FGFR3 de la invención combinando secuencia(s) de dominio variable de clones Fv seleccionadas de bibliotecas de exhibición de fagos de origen humano con secuencias de dominio constante humano conocidas de acuerdo con lo descrito anteriormente. Por otro lado, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos anti-FGFR3 de la invención por el método de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo en la obra de Kozbor J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ej., ratones) con capacidad, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de junta de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da lugar a la producción de

anticuerpos humanos tras el desafío con el antígeno. Véase, por ej., Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993).

También se puede emplear la transposición de genes para obtener anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítopes" se reemplaza la región variable de cadena pesada o liviana de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de exhibición de fagos antes descritas con un repertorio de genes de dominio V humano, generando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con el antígeno da lugar al aislamiento de un scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana en el cual la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido tras la remoción de la correspondiente cadena no humana en el clon primario de la exhibición de fago, es decir que el epítipo gobierna (imprime) la elección del asociado de cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar el resto de la cadena no humana, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril, 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto por CDR, esta técnica produce anticuerpos completamente humanos, que no tiene residuos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que presentan especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para FGFR3 y la otra es para cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopes diferentes del FGFR3. También se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan FGFR3. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a FGFR3 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ej., saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpos (por ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos

biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada–cadena liviana de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica completa. La purificación de la molécula apropiada, que habitualmente se realiza por pasos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en WO 93/08829 publicada el 13 de mayo de 1993 y por Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con una estrategia diferente y más preferida, se fusionan dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión pretendidas (sitios de combinación de anticuerpo–antígeno) a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena liviana, esté presente en por lo menos una de las fusiones. Se insertan los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados y se los cotransfecta en un organismo huésped adecuado. Esto da origen a una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en que se utilizan proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas en la construcción para producir los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando se produce la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales con altos rendimientos o cuando las proporciones no son de importancia significativa.

En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada–cadena liviana de una inmunoglobulina híbrida (que produce una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico pretendido de las

combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina sólo en una mitad de la molécula biespecífica da lugar a una forma fácil de separación. Esta estrategia ha sido descrita en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh et al., *Métodos in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otra estrategia, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos puede ser modificada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperaran del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas secundarias pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas secundarias de mayor tamaño (por ej., tirosina o triptófano). Se generan "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena (o cadenas) secundaria grande en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas secundarias de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ej., alanina o treonina). Esto otorga un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo para dirigir células del sistema inmune a las células perjudiciales (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por HIV (WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar empleando cualquier método conveniente de entrecruzamiento. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son muy conocidos en la técnica y han sido descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con un número de técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el cual se escinden proteolíticamente los anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejamiento a ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinos y prevenir la formación de

disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten seguidamente a derivados tionitrobenzoato (TNB). A continuación se reconvierte uno de los derivados Fab'-TNB al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizado. Se secretó cada fragmento Fab' por separado de *E. coli* y se lo sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 receptor y células T humanas normales, y también disparar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra blancos de tumores mamarios humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron ligados a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómero y luego se los reoxidó para formar los heterodímeros del anticuerpo. También se puede utilizar este método para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) por un ligante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, para formar así dos sitios de unión al antígeno. También se ha dado a conocer otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos

biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena simple (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que no son de la clase de IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ej. anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una Región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprende una Región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminales con respecto a la región Fe. El anticuerpo multivalente preferido comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, aunque preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena de polipéptido (y preferentemente dos cadena de polipéptido), donde la cadena o cadenas de polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptido pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una Región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena (o cadenas) de polipéptido puede comprender: cadena VH-CH1-ligante flexible-VH-CH1-Región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-Región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente comprende además, preferentemente, por lo menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. El anticuerpo multivalente de la presente puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena liviana. Los polipéptidos de dominio variable de cadena liviana contemplados en este documento comprenden un dominio variable de cadena liviana y, opcionalmente, comprenden asimismo un dominio CL.

Variantes de Anticuerpos

En algunas realizaciones, se contempla una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser ventajoso mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan secuencias de aminoácidos variantes del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o bien mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en cuestión en el momento de generar la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081–1085. En este caso, se identifica un residuo o grupo de residuos objetivo (por ej., residuos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se los reemplaza con un aminoácido de carga neutra o negativa (muy preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego introduciendo otras o diferentes variantes en o para los sitios de sustitución. Por consiguiente, si bien el sitio para la introducción de una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario determinar la mutación per se. Por ejemplo, para analizar la eficiencia de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo la mutagénesis por barrido con alanina o aleatoria en el codón o región objetivo y se seleccionan las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxil-terminales cuya longitud está en el rango de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, como así también inserciones intrasecuencia de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes por inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión al término N- o C- del anticuerpo a

una enzima (por ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

La glicosilación del polipéptido está por lo general ligada por N o ligada por O. Ligada por N se refiere al acoplamiento del resto carbohidrato a la cadena secundaria de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para el acoplamiento enzimático del resto carbohidrato a la cadena secundaria de asparagina. Por consiguiente, la presencia de uno cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido genera un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada por O se refiere al acoplamiento de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, muy comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de la secuencias de tripeptidos antes descriptas (en el caso de los sitios de glicosilación N-ligados). La alteración se puede realizar asimismo mediante la adición, o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (en el caso de los sitios de glicosilación O-ligados).

En los casos en que el anticuerpo comprende una Región Fc, se puede alterar el carbohidrato acoplado a la misma. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa acoplada a una Región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2003/0157108 (Presta, L.). Véase asimismo US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a los anticuerpos con N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato acoplado a una Región Fc del anticuerpo en WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y en la Patente de Estados Unidos No. 6.602.684, Umana et al. Se dieron a conocer anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido acoplado a una Región Fc del anticuerpo en WO 1997/30087, Patel et al. Véase, además, WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) en lo que respecta a anticuerpos con carbohidratos modificados acoplados a la Región Fc de los mismos. Véase asimismo US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión al antígeno con glicosilación modificada.

La variante de glicosilación preferida en la presente comprende una Región Fc, en la cual una estructura de carbohidrato acoplada a la Región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la Región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la Región Fc (numeración Eu de residuos). Entre los ejemplos de publicaciones relativas a anticuerpos “desfucosilados” o “con deficiencia de fucosa” se cuentan: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yaman–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados se incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de la proteína (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); Sol. de patente de los Estados Unidos 2003/0157108 A1, Presta, L y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares con desactivación (Knockout) tales como el gen de alfa–1,6–fucosiltransferasa, FUT8, células CHO knockout (Yaman–Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen el reemplazo de por lo menos un residuo aminoácido (por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos 4 o más) en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, aunque también se contemplan las alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras están expuestas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento “sustituciones preferidas.” Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio de la actividad biológica, luego se pueden introducir cambios más sustanciales denominados “sustituciones ilustrativas” en la Tabla 1, o como se describe más adelante en mayor detalle con referencia a las clases de aminoácidos, y analizar los productos.

Tabla 1

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

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, en conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el grueso de la cadena secundaria. Los residuos de origen natural se dividen en grupos sobre la base de las propiedades comunes de la cadena secundaria:

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

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

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

(5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevan el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante por sustitución conlleva la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ej., un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la variante (o variantes) obtenidas para el posterior desarrollo tiene propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo progenitor del cual se los genera. Una manera conveniente de generar dichas variantes por sustitución conlleva la maduración de la afinidad utilizando exhibición de fagos. En pocas palabras, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ej., 6–7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos así generados se exhiben en partículas de fago filamentosos en forma de fusiones al producto génico III de M13 empacado en cada partícula. Las variantes exhibidas en fagos son sometidas entonces a análisis de selección para determinar la actividad biológica (por ej., afinidad de unión) como se describe aquí. Para identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido con alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Por otro lado, o además, puede ser ventajoso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno–anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos anexos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente. Una vez generadas dichas variantes, se somete al panel de variantes a análisis de selección de acuerdo con lo descrito en la presente y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su posterior desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque no a título de limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por

oligonucleótidos (dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de una variante anteriormente preparada o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser aconsejable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una Región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, para generar así una Región Fc variante. La Región Fc variante puede comprender una secuencia de la Región Fc humana (por ej., una Región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende la modificación de un aminoácido (por ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína bisagra.

De conformidad con esta descripción y los principios de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo utilizado en los métodos de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo contraparte de tipo salvaje, por ej., en la Región Fc. Estos anticuerpos conservarían de todas maneras características sustancialmente iguales necesarias para uso terapéutico en comparación con su contraparte de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar ciertas alteraciones en la Región Fc que darían lugar a una unión a C1q y/o Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificada (es decir, mejorada o disminuida), por ej., de acuerdo con lo descrito en WO99/51642. Véase asimismo Duncan & Winter Nature 322:738–40 (1988); Patente de Estados Unidos No. 5.648.260; Patente de Estados Unidos No. 5.624.821 y WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la Región Fc. WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a las FcRs. El contenido de estas publicaciones de patente se incorpora expresamente a la presente como referencia. Véase asimismo, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591–6604 (2001). Los anticuerpos con vidas medias incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable por la transferencia de IgGs materiales al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), fueron descritos en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una Región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la Región Fc a FcRn. Los polipéptidos variantes con secuencias de aminoácidos alteradas de la Región Fc y capacidad de unión a C1q incrementada o reducida fueron descritos en la Patente de Estados Unidos No. 6.194.551B1, WO99/51642. El contenido de estas publicaciones de patente

se incorpora expresamente a la presente como referencia. Véase, además, Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178–4184 (2000).

Derivados de Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser modificados a su vez para contener otros restos no proteicos que son conocidos en la técnica y de fácil obtención. Preferentemente, los restos adecuados para la derivación del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, aunque no a título de limitación, polietilen glicol (PEG), copolímeros de etilen glicol/propilen glicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilen glicol, homopolímeros de propipilen glicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ej., glicerol), polivinil alcohol y mezclas de los mismos. El polietilen glicol propionaldehído puede tener ventajas en la elaboración debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros acoplados al anticuerpo puede variar, y se se acopla más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros empleados para la derivación puede ser determinado tomando en cuenta factores que incluyen, aunque no a título de limitación, las propiedades o funciones específicas del anticuerpo a mejorar, el hecho de si el anticuerpo derivado se va a utilizar en una terapia en condiciones definidas, etc.

Análisis de selección de anticuerpos con las propiedades buscadas

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser caracterizados por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos análisis conocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en este documento). En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por uno o más de reducción o bloqueo de la unión a FGF (como por ejemplo FGF1 y/o FGF9), reducción o bloqueo de la activación de FGFR3, reducción o bloqueo de la señalización molecular posterior del FGFR3, la alteración o bloqueo de la unión de FGFR3 a un ligando (por ej., FGF1, FGF9), reducción o bloqueo de la dimerización del FGFR3, la promoción de la formación de FGFR3 monomérico, la unión al FGFR3 monomérico y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, un trastorno proliferativo de las células o un cáncer y/o el tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR3 (tal como la

expresión y/o actividad incrementada de FGFR3). En algunas realizaciones, los anticuerpos son seleccionados para una activación incrementada de FGFR3, señalización molecular posterior incrementada del FGFR3, actividad apoptótica, regulación a menos del FGFR3 y función efectora (por ej., actividad de ADCC).

Los anticuerpos purificados pueden ser caracterizados además mediante una serie de ensayos que incluyen, aunque no a título de limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión con exclusión por tamaños no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos aquí producidos son analizados para determinar su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son analizados para determinar su actividad de unión al antígeno. Los análisis de unión al antígeno que son conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en este contexto incluyen, aunque no a título de limitación, cualquier ensayo de unión directa o competitiva que utilice técnicas tales como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente enzimático), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Más adelante, en la sección de Ejemplos se presentan ensayos ilustrativos de unión al antígeno y de otros tipos.

Si se pretende un anticuerpo anti-FGFR3 que inhiba el desarrollo de las células, se puede analizar el anticuerpo candidato en ensayos in vitro y/o in vivo que miden la inhibición del crecimiento de las células. Si se pretende un anticuerpo anti-FGFR3 que promueva, o no, la apoptosis, se puede analizar el anticuerpo candidato en ensayos que miden la apoptosis. Los métodos para examinar el crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa, o para determinar la apoptosis de una célula cancerosa son muy conocidos en la técnica y algunos han sido descritos y ejemplificados en la presente. Los métodos ilustrativos para determinar el crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis incluyen, por ejemplo, el ensayo de incorporación de BrdU, la incorporación de MTT, [3H]-timidina (por ej., el análisis TopCount (PerkinElmer)), ensayos de viabilidad de las células (por ej., CellTiter-Glo (Promega)), ensayos de fragmentación del ADN, ensayos de activación de la caspasa, exclusión con azul triptano, ensayos de morfología con cromatina y demás.

En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo que posee funciones efectoras. En ciertas realizaciones, se miden las actividades de

Fc del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden ejecutar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (y por ende carece de actividad de ADCC), pero mantiene la capacidad de unirse a FcRn. Las células primarias que median en la ADCC, células NK, expresan Fc(RII solamente, en tanto que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas está resumida en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457–92 (1991). En la Patente de Estados Unidos No. 5.500.362 o 5.821.337 se describe un ejemplo de ensayo in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés. En la presente también se ejemplifica un ensayo para detectar la actividad de ADCC. Las células efectoras útiles para esos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Killer Naturales (NK). Por otro lado, o además, se puede evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés in vivo, por ej., en un modelo animal tal como el descrito por Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652–656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y, por ende, carece de actividad de CDC. Para evaluar la activación de complementos, se puede ejecutar un ensayo de CDC, por ej., el descrito por Gazzano–Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Las determinaciones de unión de FcRn y clearance/vida media in vivo se pueden efectuar asimismo empleando métodos conocidos en la técnica, por ej., los descritos en la sección de Ejemplos.

Si se pretende un anticuerpo anti-FGFR3 que se une al FGFR3 monomérico, se puede analizar el anticuerpo candidato en ensayos (tales como ensayos in vitro) que miden la unión al FGFR3 monomérico y la promoción de la formación de FGFR3 monomérico. Esos ensayos son conocidos en la técnica y en la presente se describen y ejemplifican algunos ensayos.

Si se pretende un anticuerpo anti-FGFR3 que inhibe la dimerización de FGFR3, se puede analizar el anticuerpo candidato en ensayos de dimerización, por ej., los descritos y ejemplificados en la presente.

En algunas realizaciones, se determina la función agonista de FGFR3 del anticuerpo candidato. Los métodos para evaluar la función o actividad agonista de los anticuerpos FGFR3 son conocidos en la técnica y algunos también han sido descritos y ejemplificados en la presente.

En algunas realizaciones, se determina la capacidad de un anticuerpo FGFR3 para promover la regulación a menos del receptor FGFR3, por ej., usando métodos descritos y ejemplificados en la presente. En una realización, se incuba el anticuerpo FGFR3 con células de ensayo adecuadas, por ej., las líneas celulares de cáncer de vejiga (por ej., RT112) y después de un período de tiempo adecuado, se cosechan los lisados celulares y se los examina para determinar los niveles totales de FGFR3. También se puede utilizar el análisis FACS para examinar los niveles superficiales de receptor FGFR3 tras la incubación con los anticuerpos FGFR3 candidatos.

Vectores, Células huésped y Métodos Recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, se aísla el ácido nucleico que lo codifica y se lo inserta en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se aísla fácilmente el ADN que codifica el anticuerpo y se lo secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ej., utilizando sondas oligonucleotídicas con capacidad para unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo). Se dispone de numerosos vectores. La elección del vector depende, en parte, de la célula huésped a utilizar. Por lo general, las células huésped preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que se pueden utilizar regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD y IgE y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos empleando células huésped procariotas:

i. Construcción de Vectores

Las secuencias de polinucleótido que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención se pueden obtener empleando técnicas recombinantes standard. Se pueden aislar las secuencias polinucleotídicas deseadas y secuenciar de las células productoras del anticuerpo tales como las células de hibridoma. Por otro lado, se pueden sintetizar los polinucleótidos empleando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, se insertan las secuencias que codifican los polipéptidos en un vector recombinante con capacidad para replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Se pueden utilizar numerosos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado depende principalmente del tamaño de los

ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula huésped específica a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula huésped específica en la cual reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, aunque no a título de limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión ribosómico (RBS), una secuencia de señal, el inserto del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se utilizan vectores plásmidos que contienen secuencias de replicón y control que se obtienen de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. El vector acarrea por lo general un sitio de replicación, como así también secuencias marcadoras con capacidad para producir la selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, por lo general se transforma *E. coli* empleando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por consiguiente ofrece un fácil medio para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos pueden contener además, o ser modificados para contener, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Se describen en forma detallada los ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos específicos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.648.237 de Carter et al.

Además, se pueden utilizar vectores fagos que contienen secuencias replicón y control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida anterior (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas recaen por lo general en dos clases, inducible y constitutivo. Promotor inducible es un promotor que inicia niveles incrementados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición del cultivo, por ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. El promotor seleccionado puede estar operativamente ligado al ADN cistrón que codifica la cadena liviana o pesada retirando el promotor del ADN de origen mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor aislada en el vector de la invención. Se puede utilizar tanto la secuencia nativa del promotor como numerosos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes objetivo. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que por lo general permiten una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen objetivo expresado, en comparación con el polipéptido promotor objetivo.

Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, a sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o trc. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en las bacterias (como por ejemplo otros promotores bacterianos o fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo así a un técnico capacitado ligarlos operativamente a los cistrones que codifican las cadenas liviana y pesada objetivo (Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269) utilizando ligantes o adaptadores para aportar cualquier sitio de restricción necesario.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente secuencia de señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido objetivo que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada para el propósito de la presente invención debe ser aquella que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En el caso de las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas de los polipéptidos heterólogos, se sustituye la secuencia de señal por una secuencia de señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo constituido por líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias de señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistron. En ese aspecto, las cadenas liviana y pesada de inmunoglobulina se expresan, pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ej., las cepas *trxB* de *E. coli*) confieren condiciones al citoplasma que son favorables para la formación de enlaces de disulfuro, y de esa manera permiten un plegamiento y ensamble correctos de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Entre los ejemplos de bacterias útiles se cuentan *Escherichia* (por ej., *E. coli*), *Bacilli* (por ej., *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ej., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una realización, se utilizan células gram-negativas. En una realización, se utilizan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Los ejemplos de Cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190–1219; Depósito en la ATCC No. 27,325) y derivados de las mismas, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de los Estados Unidos No. 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivadas de las mismas tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Los métodos para la construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, por Bass et al., *Proteins*, 8:309–314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas tomando en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden utilizar especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* adecuadamente como huésped cuando se utilizan plásmidos conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para aportar el replicón. Por lo general la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar convenientemente otros inhibidores de la al cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión antes descritos y se las cultiva en medios nutrientes convencionales modificados de manera apropiada para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procariota de manera que el ADN se pueda replicar, ya sea como elemento extracromosómico o por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza empleando técnicas standard apropiadas para esas células. Generalmente se utiliza el tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared celular. Otro método de transformación emplea polietilen glicol/DMSO. Otra de las técnicas empleadas es la electroporación.

Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención son cultivadas en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Entre los ejemplos de medios adecuados se cuentan el caldo Luria (LB) más suplementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio contiene además un agente de selección, elegido sobre la base de la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el desarrollo de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se agrega ampicilina al medio para cultivar células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

También se puede incluir cualquier suplemento necesario, aparte de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico en concentraciones apropiadas, introducido solo o en forma de mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de complejo de nitrógeno. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitrol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el desarrollo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida está en el rango de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferentemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, aun más preferentemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. En el caso de *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce la expresión de la proteína en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se utilizan promotores PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células huésped transformadas se cultivan en un medio con limitación del fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitador del fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ej., Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133–147). Se puede utilizar una variedad de inductores adicionales, según la construcción del empleada, como se sabe en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células huésped y se recuperan del mismo. La recuperación de proteínas conlleva por lo general la alteración del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, ultrasonido o lisis. Una vez desbaratadas las células, se puede retirar el desecho celular o células enteras por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden ser purificadas adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía de afinidad con resina. Por otro lado, las proteínas pueden ser trasladadas al medio de cultivo y aisladas en el mismo. Se pueden retirar las células del cultivo y del sobrenadante de cultivo que se está filtrando y concentrarlas para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden ser aislados e identificados a su vez utilizando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y análisis de Western blot.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Se dispone de diversos procedimientos de fermentación discontinua en gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones en gran escala tienen por lo menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferida de carbono/energía). Fermentación en pequeña escala se refiere, en general, a la fermentación en un fermentador que no tiene una capacidad volumétrica superior a 100 litros y puede estar en el rango de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, por lo general se inicia la inducción de la expresión de proteína una vez que las células se han desarrollado, en condiciones adecuadas, a una densidad deseada, por ej., una DO550 de aproximadamente

180–220, etapa en la cual las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede utilizar una variedad de inductores, según la construcción del vector empleada, como se conoce en la técnica y se describiera anteriormente. Las células pueden ser cultivadas durante períodos más breves antes de la inducción. Habitualmente se induce a las células durante aproximadamente 12–50 horas, si bien se puede utilizar un período de inducción más prolongado o más breve.

Para mejorar el rendimiento productivo y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el armado y plegamiento correctos de los polipéptidos del anticuerpo secretado, se pueden utilizar otros vectores que sobreexpresan proteínas chaperonas tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, y/o DsbG) o FkpA (a peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para cotransformar las células huésped procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento correcto y la solubilidad de las proteínas heterólogas producidas en las células huésped bacterianas. Chen et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:19601–19605; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos No. 6.083.715; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos No. 6.027.888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100–17105; Ramm y Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106–17113; Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199–210.

Para minimizar la proteólisis de las proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles) se pueden utilizar ciertas cepas huésped deficientes para las enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, se pueden modificar cepas de células huésped para efectuar una o más mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Se dispone de algunas cepas de E. coli con deficiencia de proteasa y han sido descritas, por ejemplo, por Joly et al., (1998), supra; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos No. 5.264.365; Georgiou et al., Patente de los Estados Unidos No. 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63–72 (1996).

En una realización, se utilizan cepas de E. coli con deficiencia de enzimas proteolíticas y se las transforma con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

iii. Purificación de Anticuerpos

Se pueden emplear métodos standard de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de los procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmutafinidad o intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se utiliza Proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmutafinidad de los productos anticuerpos de longitud total de la invención. La proteína A es una proteína de 41kD de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une con elevada afinidad a la Región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al., (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida en la cual se inmoviliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna ha sido revestida con un reactivo, por ejemplo glicerol, en un intento por prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como primer paso de purificación, se aplica la preparación derivada del cultivo celular antes descrito a la fase sólida inmovilizada con Proteína A para permitir la unión del anticuerpo de interés a la Proteína A. A continuación se lava la fase sólida para eliminar los contaminantes unidos de modo no específico a la fase sólida. Por último se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida mediante elución.

b. Generación de anticuerpos empleando células huésped eucariotas:

Los componentes del vector incluyen en general, aunque no a título de limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente Secuencia de Señal

Un vector para usar en la célula huésped eucariota puede contener además una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente una secuencia reconocida y procesada (es decir, escindida por la peptidasa de señal) por la célula huésped. En la expresión en células de mamífero, se dispone de secuencias de señal de

mamífero, como así también líderes secretorias virales, por ejemplo la señal de herpes simplex gD.

El ADN correspondiente a dicha región precursora se liga en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

Por lo general, un componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, se puede utilizar típicamente el origen SV40 sólo porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente genes de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ej., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, en caso de ser pertinente o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en medios complejos.

Un ejemplo de esquema de selección utiliza una droga para detener el desarrollo de una célula huésped. Las células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere fármaco resistencia y por consiguiente sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan las drogas neomicina, ácido microfenólico e higromicina.

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

Por ejemplo, en primer lugar se identifican las células transformadas con el gen de selección DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad de DHFR (por ej., ATCC CRL-9096).

Por otro lado, se pueden seleccionar las células huésped (especialmente huéspedes de tipo salvaje que contienen un DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-

fosfotransferasa (APH) mediante cultivo celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ej., kanamicina, neomicina, o G418. Ver la Patente de los Estados Unidos No. 4.965.199.

(iv) Componente promotor

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

La transcripción de los polipéptidos de anticuerpos de vectores en células huésped de mamífero es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), papiloma virus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores termosensibles, siempre que esos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente en forma de fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huésped de mamífero que utiliza un papiloma virus bovino como vector ha sido descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4.419.446. En la Patente de los Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Por otro lado, se puede utilizar la repetición terminal larga del Virus de Sarcoma Rous como promotor.

(v) Componente elemento potenciador

La transcripción del ADN que codifica el anticuerpo polipéptido de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa con frecuencia

mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen numerosas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Por lo general, sin embargo, se suele emplear un potenciador de un virus o células eucariotas. Entre los ejemplos se cuentan el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100–270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase asimismo Yaniv, *Nature* 297:17–18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia polipeptídica codificadora del anticuerpo, aunque preferentemente está situado 5' con respecto al promotor.

(vi) Componente de Terminación de la Transcripción

Los vectores de expresión empleados en las células huésped eucariotas por lo general contienen asimismo secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se pueden obtener comúnmente de las regiones sin traducir 5' y, ocasionalmente, 3', de los ADNs o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos en forma de fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Ver WO94/11026 y el vector de expresión descrito en ese documento.

(vii) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente incluyen células eucariotas superiores descritas en la presente, incluyendo células huésped de vertebrado. La propagación de las células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas útiles de células huésped de mamífero son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS–7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonada para desarrollarse en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /–DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) ; células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO–76, ATCC CRL–1587); células de carcinoma

cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); hepatocitos humanos (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humana (Hep G2).

Se transforman células huésped con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias pretendidas.

(viii) Cultivo de las células huésped

Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles en el comercio tales como F10 Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI–1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, se puede utilizar cualquiera de los medios descritos por Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de los Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de U.S. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede ser suplementado según lo necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), buffers (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMICINA™ drug), oligoelementos (que se definen como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serían de conocimiento de las personas con capacitación en la técnica. Las condiciones de cultivo, como por ejemplo la temperatura, pH y demás, son las empleadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión y debe ser evidente para la persona con capacitación normal en la.

(ix) Purificación del Anticuerpo

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente o secretarlo directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce en forma intracelular, como primer paso, se eliminan los desechos celulares, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, generalmente se concentran en primer lugar los sobrenadantes de esos sistemas de expresión utilizando un filtro de concentración de proteínas existente en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de los pasos mencionados para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el desarrollo de contaminantes accidentales.

La composición del anticuerpo preparada con las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, entre las cuales la cromatografía de afinidad es la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina Fc que esté presente en el anticuerpo. La Proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1–13 (1983)). La proteína G es recomendable para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se acopla el ligando de afinidad es casi siempre agarosa, aunque se dispone de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno dan lugar a caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más breves de los que se puede obtener con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También existen otras técnicas para la purificación de proteínas, como por ejemplo fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio de aniones o cationes (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Después de cualquier paso de purificación preliminar, se puede someter a la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH utilizando un buffer de elución a

un pH de entre aproximadamente 2,5–4,5, ejecutada preferentemente con concentraciones bajas de sal (por ej., sal de aproximadamente 0–0,25 M).

Inmunoconjugados

La invención presenta asimismo inmunoconjugados (denominados de manera intercambiable “conjugados anticuerpo–droga” o “ADC”), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti–FGFR3 descritos en la presente conjugados a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados anticuerpo–droga para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir drogas para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605–614; Niculescu–Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151–172; Patente de los Estados Unidos No. 4.975.278) permite la administración dirigida de la porción farmacológica a los tumores y la acumulación intracelular de la misma, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar lugar a niveles inadmisibles de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se pretende eliminar (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603–05; Thorpe, (1985) “Anticuerpo Carriers Of Agentes citotóxicos In Cancer Therapy: A Review,” in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475–506). De esa manera se busca la eficacia máxima con mínima toxicidad. Se ha informado la utilidad tanto de anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales en estas estrategias (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183–87). Las drogas empleadas en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, methotrexato y vindesina (Rowland et al., (1986) obra citada). Las toxinas empleadas en los conjugados anticuerpo–toxina incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina de la difteria, toxinas vegetales tales como ricino, toxinas de pequeñas moléculas tales como geldanamicina (Mandler et al (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573–1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025–1028; Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786–791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618–8623) y caliqueamicina (Lode et al., (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53:3336–3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que

incluyen la unión a tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunas drogas citotóxicas tienden a ser inactivas o menos activas cuando están conjugadas a grandes anticuerpos o ligandos del receptor de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto por una IgG1 de anticuerpo monoclonal murino kappa dirigido contra el antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido mediante un ligante-quelante de tiourea (Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766–77; Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336–42; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453–63; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262–69). Si bien ZEVALIN tiene actividad contra el Linfoma de Células B no de Hodgkin (NHL), su administración da lugar a citopenias severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo droga compuesto por un anticuerpo CD33 hu ligado a caliqueamicina fue aprobado en el 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda por inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; Patentes de Estados Unidos Nos. 4.970.198; 5.079.233, 5.585.089, 5.606.040, 5.6937.62, 5.739.116, 5.767.285, 5.773.001). Cantuzumab maitansine (Immunogen, Inc.), un conjugado anticuerpo droga compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el ligante de disulfuro SPP a la porción droga maitansinoide, DM1, está avanzando a los ensayos en Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como el de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado anticuerpo droga compuesto por el anticuerpo monoclonal contra el antígeno membrana específico de la próstata (PSMA) ligado a la porción droga maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el potencial tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, fueron conjugados a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Y Lewis en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778–784) y están siendo objeto de desarrollo terapéutico.

En la presente se describen agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de inmunoconjugados (por ej., en párrafos anteriores). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina

de la difteria cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricino, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidos de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Ver, por ej., WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993. Se dispone de una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan empleando una variedad de agentes multifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridyliditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino de acuerdo con lo descrito por Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético marcado con Carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

Conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de pequeñas moléculas tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065 y los derivados de estas toxinas con actividad de toxina también están contemplados en la presente.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud total o fragmentos) de la invención conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de Africa oriental *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos No. 3.896.111). Seguidamente, se descubrió que ciertos microbios también producían maitansinoides, como por ejemplo maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de los Estados Unidos No. 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos han sido descritos, por ejemplo, en las Patentes de los

Estados Unidos Nos. 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 y 4.371.533.

Las porciones de drogas maitansinoides son porciones farmacológicas atractivas en los conjugados anticuerpo droga puesto que son: (i) relativamente accesibles para preparar, por fermentación o modificación química, la derivación de productos de la fermentación, (ii) se prestan al procesamiento con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante ligantes no de disulfuro a anticuerpos, (iii) son estables en plasma y (iv) son eficaces contra una variedad de líneas celulares de tumores.

Los inmunoconjugados con contenido de maitansinoides, métodos para su preparación y su uso terapéutico han sido descriptos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.208.020, 5.416.064 y en la patente europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente a la presente como referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618–8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células cultivadas de cáncer de colon y exhibía actividad antitumoral en un ensayo de desarrollo de tumores in vivo. Chari et al., Cancer Research 52:127–131 (1992) describen inmunoconjugados en los cuales se conjugó un maitansinoide por medio de un ligante de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER–2/neu. Se analizó in vitro la citotoxicidad del conjugado TA.1–maitansinoide sobre la línea celular de cáncer mamario humano SK–BR–3, que expresa 3×10^5 HER–2 antígenos superficiales por célula. El conjugado de la droga logró un grado de citotoxicidad similar al de la droga maitansinoide libre, que se podría incrementar aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7–maitansinoide exhibió baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados anticuerpo–maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Ver, por ej., Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020 (la memoria descriptiva de la cual se incorpora expresamente a la presente como

referencia). Un promedio de 3–4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficiencia para potenciar la citotoxicidad de las células objetivo sin afectar negativamente la función ni la solubilidad del anticuerpo, si bien se estimaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciaría la citotoxicidad con respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y se los puede sintetizar por técnicas conocidas o aislar de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados han sido descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020 y en otras publicaciones de patente y no de patente que se mencionaran anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como por ejemplo varios ésteres de maitansinol.

Hay numerosos grupos ligantes conocidos en la técnica para la preparación de conjugados anticuerpo–maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127–131 (1992) y Solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/960.602, presentada el 8 de Oct., 2004, las memorias descriptivas de las cuales se incorporan expresamente a la presente como referencia. Los conjugados anticuerpo–maitansinoide que comprenden el componente ligante SMCC se pueden preparar de acuerdo con lo descrito en la Solicitud de patente de los Estados Unidos No. 10/960,602, presentada el 8 de Oct., 2004. Los grupos ligantes incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábiles, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa, de acuerdo con lo descrito en las patentes antes identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en la presente otros grupos ligantes.

Se pueden preparar conjugados del anticuerpo y maitansinoide utilizando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N–succinimidil–3–(2–piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil–4–(N–maleimidometil) ciclohexan–1–carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis–azido (tales como bis (p–azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis–diazonio (tales como bis–(p–diazoniumbenzoil)–etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6–diisocianato) y compuestos de flúor bis–activos (tales como 1,5–difluoro–2,4–dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento especialmente

preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para producir un ligamiento de disulfuro.

El ligante puede estar acoplado a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace de éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que contiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 con un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el immunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatinas o análogos peptídicos y los derivados de dolostatina, las auristatinas (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.635.483 y 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerosa (Patente de los Estados Unidos No. 5.663.149) y antifúngica (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). La porción farmacológica de dolostatina o auristatina puede estar acoplada al anticuerpo a través del término N (amino) o del término C (carboxilo) de la porción droga peptídica (WO 02/088172).

Las realizaciones ilustrativas de auristatina incluyen las porciones de la droga monometilauristatina ligadas en el término N DE y DF, descritas en "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," Acta E.E.U.U. No. 10/983.340, presentada el 5 de Nov., 2004, la memoria de la cual se incorpora expresamente a la presente como referencia en su totalidad.

Por lo general, las porciones farmacológicas basadas en péptidos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides," tomo 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de péptidos. Las porciones farmacológicas auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos de las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.635.483 y 5.780.588; Pettit

et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463–5465; Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243–277; Pettit, G.R., et al., Synthesis, 1996, 719–725 y Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859–863. Véase asimismo Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778–784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," Acta de E.E.U.U. No. 10/983,340, presentada el 5 de nov. de 2004, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad (que describe, por ej., ligantes y métodos para la preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados ligantes).

iii. Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina tiene la capacidad de producir roturas de ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, ver las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas ellas concedidas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar incluyen, aunque no a título de limitación, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG and θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336–3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925–2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos concedidas a Cyanamid antes mencionadas). Otra droga antitumoral a la que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia considerablemente su efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.053.394 y 5.770.710, como así también las esperamicinas (Patente de los Estados Unidos No. 5.877.296).

Se pueden utilizar toxinas con actividad enzimática y fragmentos de las mismas que incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricino A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina,

proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de dianthin, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ej., una ribonucleasa o una DNA endonucleasa tal como una desoxiribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de espín para captar imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imágenes de resonancia magnética, mri), tales como yodo-123 una vez más, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores o marcadores de otro tipo se pueden incorporar al conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, se puede biosintetizar el péptido o se lo puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que incluyen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Puede haber marcadores tales como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} y In^{111} a través de un residuo de cisteína del péptido. Se puede acoplar ytrio-90 a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonales Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en forma detallada.

Se pueden preparar conjugados de anticuerpo y agente citotóxico empleando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina),

diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino de acuerdo con lo descrito por Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligante puede ser un "ligante escindible", que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un ligante lábil en ácido, un ligante sensible a la peptidasa, un ligante fotolábil, un ligante de dimetilo o un ligante con contenido de disulfuro (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos No. 5.208.020).

(n) Los compuestos de la invención contemplan expresamente, aunque no a título de limitación, ADC preparado con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el comercio (por ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Ver las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

(o) v. Preparación de conjugados anticuerpo droga

En los conjugados anticuerpo droga (ADC) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) a una o más porciones de droga (D), por ej. aproximadamente 1 a aproximadamente 20 porciones droga por anticuerpo, a través de un ligante (L). El ADC de la Formula I se puede preparar por varias vías, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por las personas con capacitación en la técnica, que incluyen: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo ligante bivalente, para formar Ab-L, por medio de un enlace covalente, seguida por la reacción con una porción de droga D y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de una porción de droga con un reactivo ligante bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguida por la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. En la presente se describen otros métodos para la preparación de ADC.



El ligante puede estar compuesto por uno o más componentes ligantes. Los componentes ligantes ilustrativos incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"),

maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1 carboxilato ("SMCC") y N-Succinimidil (4-iodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Otros componentes ligantes son conocidos en la técnica y en la presente se describen algunos de ellos. Véase asimismo "Monometilvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," Acta de E.E.U.U. No. 10/983.340, presentada el 5 de nov, 2004, el contenido de la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, el ligante puede comprender residuos aminoácidos. Los componentes ligantes aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ilustrativos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ilustrativos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos aminoácidos que comprenden un componente ligante aminoácido incluyen los de origen natural, como así también aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural tales como citrulina. Los componentes ligantes aminoácidos pueden ser diseñados y optimizados en su selectividad por la escisión enzimática por enzimas específicas, por ejemplo una proteasa asociada a tumores, cathepsina B, C and D, o una plasmina proteasa.

Los grupos nucleofílicos de los anticuerpos incluyen, aunque no a título de limitación: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadena secundaria, por ej. lisina, (iii) grupos tiol de cadena secundaria, por ej. cisteína y (iv) grupos azúcar hidroxilo o amino en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y con capacidad de reaccionar formando enlaces covalentes con grupos electrofílicos de las porciones ligantes y reactivos ligantes entre los que se incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir puentes de cisteína. Se pueden preparar anticuerpos reactivos para la conjugación con reactivos ligantes mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína forma entonces, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que dan lugar a la conversión de una amina en un tiol. Se pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro, o más

residuos de cisteína (por ej., preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos aminoácidos no nativos de cisteína).

Los conjugados anticuerpo droga de la invención se pueden producir asimismo mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrofílicas, que pueden reaccionar con los sustituyentes nucleofílicos del reactivo ligante o droga. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ej., con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos ligantes o porciones farmacológicas. Los grupos imina base de Schiff así obtenidos pueden formar un ligamiento estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar ligamientos amínicos estables. En una realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados de la droga (Hermanson, *Bioconjugate Técnicas*). En otra realización, las proteínas con contenido de residuos serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, para dar lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138–146; Patente de los Estados Unidos No. 5.362.852). Se puede hacer reaccionar dicho aldehído con una porción droga o un nucleófilo ligante.

Del mismo modo, los grupos nucleofílicos de una porción droga pueden incluir, aunque no a título de limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida con capacidad para reaccionar y formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en porciones ligantes y reactivos ligantes que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Por otro lado, se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ej., mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido ligante que no destruye las propiedades ventajosas del conjugado.

En otra de las realizaciones, el anticuerpo puede estar conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-direccionamiento

al tumor donde se administra el conjugado anticuerpo–receptor al individuo, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación empleando un agente aclarante y luego la administración de un “ligando” (por ej., avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ej., un radionucleótido).

Métodos para utilizar los anticuerpos anti–FGFR3

La presente invención da a conocer el uso de un anticuerpo FGFR3 como parte de un régimen de tratamiento específico con el fin de otorgar un efecto benéfico por la actividad de este agente terapéutico. La presente invención es especialmente ventajosa para el tratamiento de cánceres de diversos tipos en diversos estadios.

El término cáncer abarca una colección de trastornos proliferativos, incluyendo, aunque no a título de limitación, excrecencias precanceroas, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos permanecen localizados en el sitio de origen y no tiene la capacidad de infiltrarse, invadir ni metastizarse a sitios remotos. Los tumores malignos invades y dañan otros tejidos que los rodean. También pueden incorporar la capacidad de separarse del sitio original y propagarse a otras partes del cuerpo (metastizarse), habitualmente a través del torrente sanguíneo o a través del sistema linfático donde están situados los ganglios linfáticos. Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido del cual surge; los tumores metastáticos se clasifican por el tipo de tejido del cual derivan las células cancerosas. Con el tiempo, las células de un tumor maligno se tornan más anormales y se asemejan menos a las células normales. Este cambio de aspecto de las células cancerosas se denomina grado del tumor y las células cancerosas se describen como bien diferenciadas (bajo grado), moderadamente diferenciadas, poco diferenciadas o no diferenciadas (alto grado). Las células bien diferenciadas son de aspecto bastante normal y se asemejan a las células normales de las cuales se originan. Las células indiferenciadas son células que ya son tan anormales que no es posible determinar el origen de las mismas.

Las técnicas de determinación de los estadios del cáncer describen hasta dónde se ha propagado el cáncer anatómicamente e intentan asignar a los pacientes con prognosis y tratamientos similares en el mismo grupo de estadio. Se puede realizar varias pruebas para contribuir a determinar el estadio del cáncer, incluyendo la biopsia y ciertas pruebas de imágenes tales como radiografía de tórax, mamografía, ecografía ósea, tomografía computada y resonancia magnética. También se utilizan análisis de sangre y evaluación clínica para

evaluar el estado de salud general de un paciente y detectar si el cáncer se ha propagado a ciertos órganos.

Para determinar los estadios del cáncer el American Joint Committee on Cancer ubica al cáncer, especialmente los tumores sólidos, en categorías de letras utilizando el sistema de clasificación TNM. Los cánceres se designan con la letra T (tamaño del tumor), N (nódulos palpables) y/o M (metástasis). T1, T2, T3 y T4 describen el aumento de tamaño de la lesión primaria; N0, N1, N2, N3 indica el compromiso de avance progresivo de los ganglios y M0 y M1 reflejan la ausencia o presencia de metástasis distantes.

En el segundo método de determinación de estadios, también conocido como Overall Stage Grouping (Agrupación por Estadios Generales) o Roman Numeral Staging (determinación de estadios con números romanos), los cánceres se dividen en estadios 0 a IV, que incorporan el tamaño de las lesiones primarias así como la presencia de propagación a los ganglios y de metástasis distantes. En este método, se agrupan los casos en cuatro estadios indicados por los números romanos I a IV, o se los clasifica como "recidivantes". En el caso de algunos cánceres, se hace referencia al estadio 0 como "in situ" o "Tis", como por ejemplo el carcinoma ductal in situ o carcinoma lobular in situ en el caso de los cánceres mamarios. Los adenomas de alto grado también se pueden clasificar como estadio 0. En general, los cánceres en estadio I son pequeños cánceres localizados que habitualmente son curables, en tanto que la etapa IV representa habitualmente cáncer inoperable o metastático. Los cánceres en Estadio II y III son habitualmente avanzados localmente y/o exhiben compromiso de los ganglios linfáticos locales. En general, los números de estadio más elevados indican enfermedad más extendida, incluyendo un mayor tamaño de los tumores y/o propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos y/u órganos adyacentes al tumor primario. Estos estadios se definen con precisión, aunque la definición es diferente por cada tipo de cáncer y es de conocimiento del profesional experto.

Muchos registros de cáncer, tales como el Programa de Supervisión, Epidemiología y Resultados finales del NCI (SEER), utilizan la determinación sumaria de estadios. Este sistema se utiliza para todos los tipos de cáncer. Agrupa al cáncer en cinco categorías principales:

In situ es el cáncer temprano que sólo está presente en la capa de células en las que se iniciara.

Localizado es el cáncer que se limita al órgano en el cual comenzara, sin evidencia de propagación.

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

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

El término desconocido se utiliza para describir casos de los cuales no hay suficiente información para indicar un estadio.

Además, es común que el cáncer recidive meses o años después de la remoción del tumor primario. El cáncer que recurre una vez que se ha erradicado la totalidad del tumor visible se denomina enfermedad recidivante. La enfermedad que recidiva en la zona del tumor primario es localmente recidivante y la enfermedad que recurre en forma de metástasis se denomina recidiva distante.

El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor de tejidos no sólidos o blandos. Los ejemplos de tumores de tejidos blandos incluyen leucemia (por ej., leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda del adulto, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de células B maduras, leucemia linfocítica crónica, leucemia polinfocítica o leucemia de células pilosas) o linfoma (por ej., linfoma no de Hodgkin, linfoma cutáneo de células T o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos corporales aparte de sangre, médula ósea o sistema linfático. Los tumores sólidos se pueden dividir a su vez en los de origen de células epiteliales y los de origen de células no epiteliales. Entre los ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales se incluyen los tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario, cabeza y cuello, cavidad oral, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula, labio, nasofaringe, piel, útero, órgano genital masculino, órganos urinarios, vejiga y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores óseos. Se describen otros ejemplos de tumores en la sección Definiciones.

En algunas realizaciones, en este contexto se somete al paciente a un análisis de diagnóstico por ej., antes y/o durante y/o después de la terapia. Por lo general, si se realiza una prueba de diagnóstico, se puede obtener una muestra del paciente que necesita terapia. Cuando el sujeto tiene cáncer, la muestra puede ser una muestra de un tumor, otra muestra biológica, tal como un fluido biológico que incluye, aunque no a título de limitación, sangre, orina, saliva, fluido ascítico o derivados de la sangre tal como suero sanguíneo y plasma sanguíneo y demás.

La muestra biológica de la presente puede ser una muestra fijada, por ej. una muestra fijada en formalina, incrustada en parafina (FFPE) o una muestra congelada.

Los diversos métodos para determinar la expresión del ARNm o proteína incluyen, aunque no a título de limitación, obtención de perfiles de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de micromatrices, análisis en serie de expresión génica (SAGE), MassARRAY, Análisis de Expresión Génica por Secuenciación Masiva Paralela de la Firma (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se realiza preferentemente empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por análisis de micromatriz. Cuando se emplea la PCR, una forma de PCR es PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En una realización, la expresión de uno o más de los genes antes citados se considera expresión positiva si está en la media o más, por ej. en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. Se puede determinar la mediana del nivel de expresión esencialmente al mismo tiempo que la medición de la expresión génica, o se la puede haber determinado previamente.

Los pasos de un protocolo representativo para obtener el perfil de expresión génica utilizando tejidos fijos incrustados en parafina como fuente de ARN, incluyendo el aislamiento, purificación de ARNm, extensión de cebadores y amplificación están incluidos en varios artículos periodísticos publicados (por ejemplo: Godfrey et al. *J. Molec. Diagnostics* 2: 84–91 (2000); Specht et al., *Am. J. Pathol.* 158: 419–29 (2001)). En pocas palabras, un proceso representativo se inicia con el corte de secciones de un espesor de aproximadamente 10 microgramos de muestras de tejidos tumorales incrustados en parafina. A continuación se extrae el ARN y se retira la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir pasos de reparación y/o amplificación de ARN, si fuera necesario, y se realiza la transcripción inversa del ARN utilizando promotores génicos específicos seguidos por PCR. Por último, se analizan los datos para identificar la mejor o mejores opciones de tratamiento a disposición del paciente sobre la base del patrón de expresión génica característico de la muestra de tumor examinado.

La detección de la expresión del gen o proteína se puede determinar directa o indirectamente.

Se puede determinar la expresión o traslocación o amplificación del FGFR3 en el cáncer (directa o indirectamente). Para esto se dispone de diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, se puede analizar la sobreexpresión de FGFR3 por IHC. Se puede someter a secciones de tejido incrustadas en parafina de una biopsia de tumor al análisis de IHC y aplicar un criterio de intensidad de proteína FGFR3 de la siguiente manera:

Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de la membrana en menos de 10% de las células del tumor.

Puntuación 1+ se detecta una tinción tenue/a penas perceptible de la membrana en más de 10% de las células del tumor. Las células sólo están coloreadas en parte de su membrana.

Puntuación 2+ Se observa una tinción de la membrana débil a moderada en más de 10% de las células del tumor.

Puntuación 3+ Se observa una tinción completa moderada a fuerte en más de 10% de las células del tumor.

En algunas realizaciones, los tumores con puntuaciones de 0 o 1+ con respecto a la evaluación de la sobreexpresión de FGFR3 se puede caracterizar como sin sobreexpresión de FGFR3, en tanto que los tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ se pueden caracterizar como con sobreexpresión de FGFR3.

En algunas realizaciones, los tumores con sobreexpresión de FGFR3 se pueden clasificar por puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas FGFR3 expresadas por célula y se los puede determinar bioquímicamente:

0 = 0–90 copias/célula,

1+ = por lo menos aproximadamente 100 copias/célula,

2+ = por lo menos aproximadamente 1000 copias/célula,

3+ = por lo menos aproximadamente 10.000 copias/célula.

Por otro lado, o además, se pueden llevar a cabo análisis FISH en tejido tumoral fijado en formalina, incrustado en parafina, para determinar la presencia y/o grado (si corresponde) de amplificación o traslocación del FGFR3 en el tumor.

La activación de FGFR3 se puede determinar directamente (por ej., mediante ensayos de fosfo-ELISA u otros medios para detectar el receptor fosforilado) o indirectamente (por ej., mediante detección de componentes de las vías de señalización activados en el extremo de salida, detección de dímeros del receptor (por ej., homodímeros, heterodímeros), detección de perfiles de expresión génica y demás.

Del mismo modo, se puede detectar el FGFR3 constitutivo y/o FGFR3 independiente de ligandos o dependiente de ligandos directa o indirectamente (por ej., mediante la detección de mutaciones del receptor correlacionadas con la actividad constitutiva, mediante detección de la amplificación del receptor correlacionada con la actividad constitutiva y demás).

Los métodos para la detección de mutaciones de ácido nucleico son muy conocidos en la técnica. Con frecuencia, aunque no necesariamente, se amplifica un ácido nucleico objetivo en una muestra para aportar la cantidad necesaria de material para la determinación de la existencia o no de una mutación. Las técnicas de amplificación son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, el producto amplificado puede o no abarcar la totalidad de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés, siempre que el producto amplificado comprenda la posición de la secuencia de aminoácidos/ácido nucleico específica en que, se sospecha, está la mutación.

En un ejemplo, se puede determinar la presencia de una mutación poniendo en contacto el ácido nucleico de una muestra con una sonda de ácido nucleico con capacidad para hibridarse específicamente al ácido nucleico que codifica un ácido nucleico mutado y detectando esa hibridación. En una realización, la sonda tiene un marcador detectable, por ejemplo un radioisótopo (^3H , ^{32}P , ^{33}P etc), un agente fluorescente (rodamina, fluoresceno etc.) o un agente cromogénico. En algunas realizaciones, la sonda es un oligómero antisentido, por ejemplo PNA, morfolino-fosforamidatos, LNA o 2'-alcoxialcoxi. La sonda puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 75, o aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o aproximadamente 20 a aproximadamente 30. En otro aspecto, las sondas de ácido nucleico de la invención están incluidas en un kit para identificar mutaciones de FGFR3 en una muestra, kit que comprende un oligonucleótido que se hibrida específicamente o está adyacente a un sitio de mutación en el ácido nucleico que codifica el FGFR3. El kit puede comprender además instrucciones para tratar pacientes con tumores que contienen mutaciones del FGFR3 con un antagonista de FGFR3 basándose en el resultado del análisis de hibridación que utiliza el kit.

También se pueden detectar mutaciones comparando la movilidad electroforética de un ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del correspondiente ácido nucleico que codifica el FGFR3 de tipo salvaje. Una diferencia de la movilidad indica la presencia de una mutación en la secuencia de

ácido nucleico amplificada. La movilidad electroforética se puede determinar por cualquier técnica de separación molecular apropiada, por ejemplo en un gel de poliacrilamida.

Los ácidos nucleicos también pueden ser analizados para detectar mutaciones utilizando la Detección Enzimática de Mutaciones (EMD) (Del Tito et al, Clinical Chemistry 44:731–739, 1998). La EMD utiliza el bacteriófago resolvable T_4 endonucleasa VII, que barre a lo largo del ADN bicatenario hasta que detecta y escinde las distorsiones estructurales causadas por los apareamientos erróneos de pares de bases que se producen como resultado de las alteraciones del ácido nucleico tales como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección de dos fragmentos cortos formados por la escisión con resolvable, por ejemplo por electroforesis en gel, indica la presencia de una mutación. Las ventajas del método EMD son, un solo protocolo para identificar mutaciones puntuales, deleciones e inserciones analizadas directamente de las reacciones de amplificación, eliminando la necesidad de purificar las muestras, acortando el período de hibridación y aumentando la relación de señal a ruido. Se pueden analizar muestras mixtas que contienen un exceso de hasta 20 veces de ácidos nucleicos normales y fragmentos de un tamaño de hasta 4 kb. Sin embargo, el análisis de EMD no identifica los cambios de bases específicos que tienen lugar en las muestras con mutación positiva, por lo tanto con frecuencia requiere procedimientos adicionales de secuenciación para identificar la mutación específica en caso de ser necesario. Se puede utilizar la enzima CEL I de manera similar a la resolvable T_4 endonucleasa VII, como se manifiesta en la patente de los Estados Unidos No. 5.869.245.

Otro sencillo kit para detectar mutaciones es una tira de análisis de hibridación inversa similar a la tira de análisis de Hemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para la detección de múltiples mutaciones en los genes HFE, TFR2 y FPN1 causantes de la Hemochromatosis. Dicho ensayo se basa en la hibridación de secuencias específicas después de la amplificación por PCR. Para los ensayos de mutación única, se puede aplicar un método de detección basado en microplacas, en tanto que en el caso de los ensayos de mutaciones múltiples se pueden utilizar tiras de análisis como “macromatrices”. Los kits pueden incluir reactivos listos para usar para la preparación, amplificación y detección de mutaciones de las muestras. Los protocolos de amplificación Multiplex ofrecen conveniencia y permiten el análisis de las muestras con volúmenes muy limitados. Utilizando el sencillo formato

StripAssay, se pueden completar los análisis de veinte o más mutaciones en menos de cinco horas sin equipamiento costoso. Se aísla el ADN de una muestra y se amplifica in vitro el ácido nucleico objetivo (por ej., por PCR) y se lo marca con biotina, generalmente en una sola reacción de amplificación ("multiplex"). A continuación se hibridan selectivamente los productos de la amplificación a sondas oligonucleotídicas (específicas de tipo salvaje y mutantes) inmovilizadas en un soporte sólido tal como una tira de análisis en la cual las sondas se inmovilizan en forma de líneas o bandas paralelas. Se detectan los amplicones biotinilados unidos empleando sustratos de estreptavidina–fosfatasa alcalina y de color. Ese tipo de ensayo puede detectar todas o cualquier subserie de las mutaciones de la invención. Con respecto a una banda de sonda mutante específica, hay uno a tres patrones de señalización posibles: (i) una banda sólo para la sonda de tipo salvaje que indica una secuencia normal de ácido nucleico, (ii) bandas tanto para una sonda de tipo salvaje como mutante que indica el genotipo heterocigoto y (iii) banda sólo para la sonda mutante que indica el genotipo mutante homocigoto. En consecuencia, en un aspecto, la invención presenta un método para detectar mutaciones de la invención que comprende aislar y/o amplificar una secuencia objetivo de ácido nucleico de FGFR3 de una muestra, por lo que el producto de la comprende un ligando, poner en contacto el producto de la amplificación con una sonda que comprende un asociado de unión al ligando detectable y donde la sonda tiene capacidad para hibridarse específicamente a una mutación de la invención y luego detectar la hibridación de dicha sonda a dicho producto de la amplificación. En una realización, el ligando es biotina y el asociado de unión comprende avidina o estreptavidina. En una realización, el asociado de unión comprende estreptavidina–alcalina que es detectable con sustratos de color. En una realización, las sondas son inmovilizadas, por ejemplo, en una tira de análisis en la cual las sondas complementarias de mutaciones diferentes se separan una de otra. Por otro lado, se marca el ácido nucleico amplificado con un radioisótopo, en cuyo caso no es necesario que la sonda comprenda un marcador detectable.

(p) Las alteraciones de un gen de tipo salvaje abarcan todas las formas de mutaciones tales como inserciones, inversiones, deleciones, y/o mutaciones puntuales. En una realización las mutaciones son somáticas. Las mutaciones somáticas son las que sólo tienen lugar en ciertos tejidos, por ej., en el tejido tumoral, y no se heredan en la línea germinal. Las mutaciones de línea germinal se pueden encontrar en cualquiera de los tejidos del cuerpo.

(q) Se puede obtener una muestra que comprende un ácido nucleico objetivo por métodos muy conocidos en la técnica y que son apropiados para el tipo específico y ubicación del tumor. Con frecuencia se utiliza la biopsia de tejidos para obtener un trozo representativo de tejido tumoral. Por otro lado, se pueden obtener células tumorales indirectamente en forma de tejidos/fluidos conocidos o sospechados de contener las células tumorales interés. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de lesiones de cáncer de pulmón mediante resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillados bronquiales o de esputo, fluido pleural o sangre. Se pueden detectar genes o productos génicos mutantes del tumor o de otras muestras corporales tales como orina, esputo o suero. Se pueden aplicar las mismas técnicas antes descritas para la detección de genes o productos génicos mutantes en muestras de tumores a otras muestras del cuerpo. Las células cancerosas se desprenden de los tumores y aparecen en esas muestras corporales. Al analizar dichas muestras corporales, se puede obtener un sencillo diagnóstico precoz de enfermedades tales como el cáncer. Además, se puede monitorear el progreso de la terapia más fácilmente y analizar esas muestras corporales para detectar genes objetivo o productos génicos mutantes.

(r) Los medios para enriquecer una preparación tisular en el caso de células tumorales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede aislar el tejido de secciones en parafina o criostato. También se pueden separar las células cancerosas de las células normales por citometría de flujo o microdissección de captura con láser. Estas y otras técnicas para la separación de tumores de las células normales son muy conocidas en la técnica. Si el tejido tumoral está altamente contaminado con células normales, la detección de mutaciones puede ser más difícil, si bien las técnicas para minimizar la contaminación y/o falsos resultados positivos/negativos son conocidas y algunas de las cuales se describen más adelante. Por ejemplo, una muestra puede ser evaluada asimismo para determinar la presencia de un biomarcador (incluyendo una mutación) que se sabe asociado a una célula tumoral de interés pero no a una célula normal correspondiente, o viceversa.

(s) La detección de mutaciones puntuales en los ácidos nucleicos objetivos se puede lograr mediante clonación molecular de los ácidos nucleicos objetivo y secuenciación de los ácidos nucleicos utilizando técnicas muy conocidas en el medio. Por otro lado, se pueden utilizar técnicas de amplificación tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias objetivo de ácido nucleico directamente de una preparación de ADN genómico del

tejido tumoral. Se puede determinar la secuencia de ácido nucleico de las secuencias amplificadas e identificar de las mismas las mutaciones. Las técnicas de amplificación son muy conocidas en el medio, por ej., reacción en cadena de la polimerasa descrita por Saiki et al., *Science* 239:487, 1988; patentes de los Estados Unidos Nos. 4.683.203 y 4.683.195.

(t) Se debe notar que el diseño y selección de los cebadores apropiados son técnicas muy reconocidas en el medio.

(u) También se puede utilizar la reacción en cadena de la ligasa, que se conoce en la técnica, para amplificar secuencias objetivo de ácido nucleico. Véase, , por ej., Wu et al., *Genomics*, Vol. 4, pp. 560–569 (1989). Además, también se puede emplear una técnica conocida como PCR de alelos específicos. Véase, por ej., Ruano and Kidd, *Nucleic Acid Research*, Vol. 17, p. 8392, 1989. De acuerdo con esta técnica, se utilizan cebadores que se hibridan en sus extremos 3' a una mutación específica del ácido nucleico objetivo. Si la mutación específica no está presente, no se observa un producto de la amplificación. También se puede utilizar la Amplificación Refractaria de Sistemas de Mutaciones (ARMS), de acuerdo con lo descrito en la Publicación de Solicitud de patente europea No. 0332435 y in Newton et al., *Nucleic Acid Research*, Vol. 17, p.7, 1989. También se pueden detectar inserciones y deleciones de genes mediante clonación, secuenciación y amplificación. Además, se pueden utilizar sondas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores circundantes a fin de puntuar la alteración de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. Se puede usar asimismo el análisis de polimorfismos de conformación de cadena única (SSCP) para detectar variantes por cambio de bases de un alelo. Véase, por ej. Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, pp. 2766–2770, 1989 y *Genomics*, Vol. 5, pp. 874–879, 1989. También se pueden utilizar otras técnicas para detectar inserciones y deleciones conocidas en la técnica.

(v) La alteración de genes de tipo salvaje también se puede detectar sobre la base de la alteración de un producto de la expresión del gen de tipo salvaje. Dichos productos de la expresión incluyen tanto ARNm como el producto proteico. Se pueden detectar mutaciones puntuales amplificando y secuenciando el ARNm o por medio de clonación molecular del ADNc preparado a partir del ARNm. Se puede determinar la secuencia del ADNc clonado utilizando técnicas de secuenciación de ADN que son muy conocidas en el medio. El ADNc también se puede secuenciar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

(w) Los apareamientos erróneos don dúplex de ácido nucleico hibridado que no son 100% complementarios. La falta de complementariedad total se puede deber a deleciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones por cambio de marco. La detección de apareamientos erróneos se puede utilizar para detectar mutaciones puntuales en un ácido nucleico objetivo. Si bien estas técnicas pueden ser menos sensibles que la secuenciación, son más sencillas de realizar en un gran número de muestras de tejido. Un ejemplo de técnica de escisión de apareamientos erróneos es el método de protección con Rnas, que ha sido descrito en detalles por Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 7575, 1985 y Meyers et al., Science, Vol. 230, p. 1242, 1985. Por ejemplo, un método de la invención puede implicar el uso de una ribosonda marcada que es complementaria del ácido nucleico humano de tipo salvaje objetivo. Se reasocia (hibrida) la ribosonda y el ácido nucleico objetivo derivado de la muestra de tejido entre sí y seguidamente se las digiere con la enzima Rnasa A, que puede detectar algunos apareamientos erróneos en una estructura de ARN dúplex. si se detecta un apareamiento erróneo por RNasa A, ésta se escinde en el sitio del apareamiento erróneo. De esa manera, al separarse la preparación de ARN reasociada en una matriz de gel electroforético, en caso de haberse detectado un apareamiento erróneo escindido por la Rnasa A, se ve un producto de ARN que es más pequeño que el ARN dúplex de longitud total de la ribosonda y el ARNm o ADN. No es necesario que la ribosonda tenga la longitud total del ácido nucleico, siempre que abarque la posición con una mutación sospechada. Si la ribosonda comprende sólo un segmento del ARNm o gen del ácido nucleico objetivo, puede ser conveniente utilizar un número de estas sondas para analizar la totalidad de la secuencia de ácido nucleico objetivo para detectar apareamientos erróneos si resulta conveniente.

(x) De manera similar, se pueden utilizar sondas de ADN para detectar apareamientos erróneos, por ejemplo por medio de escisión enzimática o química. Véase, por ej., Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4397, 1988 y Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, p. 989, 1975. Por otro lado, los apareamientos erróneos se pueden detectar mediante cambios de la movilidad electroforética de dúplex mal apareados con respecto a los dúplex apareados Véase, por ej., Cariello, Human Genetics, Vol. 42, p. 726, 1988. Tanto con ribosondas como con sondas de ADN, se puede amplificar el ARNm o ADN del ácido nucleico objetivo que pueda contener una mutación antes de la hibridación. También se pueden detectar cambios en el ADN del ácido nucleico utilizando

hibridación Southern, especialmente si los cambios son rearrreglos groseros tales como deleciones e inserciones.

(y) También se pueden analizar las secuencias de ADN del ácido nucleico objetivo que han sido amplificadas utilizando sondas para alelos específicos. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, cada uno de los cuales contiene una región del gen de ácido nucleico objetivo que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede tener una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos, correspondientes a una porción de la secuencia objetivo del gen. Mediante el uso de una batería de dichas sondas de alelos específicos, se pueden analizar los productos de la amplificación del ácido nucleico objetivo para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen objetivo. La hibridación de sondas específicas de alelos con secuencias de ácido nucleico amplificadas se puede realizar, por ejemplo, en un filtro de nylon. La hibridación a una sonda específica en condiciones de hibridación rigurosas indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda de alelo específico.

(z) También se puede detectar la alteración de genes objetivo de tipo salvaje seleccionando para la alteración de la correspondiente proteína de tipo salvaje. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales inmunoreactivos con un producto génico objetivo para analizar un tejido, por ejemplo un anticuerpo conocido por su unión a una posición mutada específica del producto génico (proteína). Por ejemplo, un anticuerpo que se utiliza puede ser aquel que se une a un exón suprimido o que se une a un epítipo conformacional que comprende una porción suprimida de la proteína objetivo. La falta del antígeno correspondiente indicaría una mutación. También se podrían utilizar anticuerpos específicos para productos de los alelos mutantes para detectar productos génicos mutantes. Los anticuerpos se pueden identificar de bibliotecas de exhibición de fagos. Dichos ensayos inmunológicos se pueden realizar en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Estos incluyen Western blots, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Se puede utilizar cualquier medio para detectar una proteína alterada para detectar una alteración de los genes de tipo salvaje objetivo.

(aa) Los pares de cebadores son útiles para la determinación de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objetivo empleando técnicas de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Los pares de cebadores de ADN monocatenario pueden ser

asociados a secuencias dentro o alrededor de la secuencia de ácido nucleico objetivo para impulsar la amplificación de la secuencia objetivo. También se pueden utilizar cebadores para alelos específicos. Dichos cebadores sólo se asocian a una secuencia objetivo mutante específica y, de esa manera, sólo amplifican un producto en presencia de la secuencia objetivo mutante como modelo. Para facilitar la posterior clonación de las secuencias amplificadas, los cebadores pueden tener sitios de restricción enzimática anexados a sus extremos. Dichas enzimas y sitios son muy conocidos en la técnica. Los cebadores en sí pueden ser sintetizados utilizando técnicas que son muy conocidas en el medio. En general, los cebadores se pueden preparar utilizando máquinas sintetizadoras de oligonucleótidos existentes en el comercio. El diseño de los cebadores específicos es de competencia de las personas expertas en la técnica.

(bb) Las sondas de ácido nucleico son de utilidad para un número de fines. Se las puede utilizar en hibridación Southern al ADN genómico y en el método de protección con RNasa para detectar mutaciones puntuales descritas anteriormente. Las sondas se pueden utilizar para detectar productos de la amplificación de ácidos nucleicos. También se las puede utilizar para detectar apareamientos erróneos con el gen de tipo salvaje o ARNm utilizando otras técnicas. Los apareamientos erróneos se pueden detectar empleando otras enzimas (por ej., S1 nucleasa), sustancias químicas (por ej., hidroxilamina o tetraóxido de osmio y piperidina), o cambios de la movilidad electroforética de los híbridos mal apareados en comparación con los híbridos totalmente apareados. Estas técnicas son conocidas en el medio. Ver Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, p. 586, 1986. En general, las sondas son complementarias de secuencias fuera del dominio de quinasas. Se puede utilizar toda una batería de sondas de ácido nucleico para comparar un kit para la detección de mutaciones en los ácidos nucleicos objetivo. El kit da lugar a la hibridación a una gran región de una secuencia objetivo de interés. Las sondas se pueden superponer entre sí o ser contiguas.

(cc) Si se utiliza una ribosonda para detectar malos apareamientos con el ARNm, ésta generalmente es complementaria del ARNm del gen objetivo. Por consiguiente, la ribosonda es una sonda antisentido por el hecho de que no codifica para el producto génico correspondiente porque es complementaria de la cadena de sentido. Por lo general la ribosonda está marcada con un material radiactivo, colorimétrico o fluorimétrico, lo que se puede obtener por cualquier medio conocido en la técnica. Si se utiliza la ribosonda para detectar

apareamientos erróneos con ADN, puede ser de cualquier polaridad, de sentido o antisentido. Del mismo modo, también se pueden utilizar sondas de ADN para detectar apareamientos erróneos.

(dd) En algunos casos, el cáncer sobreexpresa o no el FGFR3. La sobreexpresión del receptor se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles incrementados de la proteína receptora presente en la superficie de una célula (por ej. mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Por otro lado, o además, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el receptor en la célula, por ej. mediante técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH; ver WO98/45479 publicada en octubre de 1998), southern blotting, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como por ejemplo PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Aparte de los ensayos mencionados, el profesional capacitado dispone de diversos ensayos in vivo. Por ejemplo, se puede exponer a las células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ej. un isótopo radiactivo y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ej. mediante exploración externa para determinar la radiactividad o analizando una biopsia extraída del paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Agentes quimioterapéuticos

La terapia combinatoria de la invención puede comprender además uno o más agentes quimioterapéuticos. La administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, utilizando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente existe un período de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

El agente quimioterapéutico, en caso de administrárselo, se administra habitualmente en las dosis conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de las drogas o a efectos secundarios adversos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico de antimetabolitos. Se puede utilizar la preparación y regímenes de dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o mediante determinación empírica por el profesional experto.

En la presente se consignan diversos agentes quimioterapéuticos que se pueden combinar.

En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos a combinar son seleccionados del grupo que consiste en lenalidomide (REVLIMID), inhibidores del

proteosoma (tales como bortezomib (VELCADE) y PS342), bora taxoide (incluyendo docetaxel y paclitaxel), vinca (tal como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tal como carboplatino o cisplatino), inhibidor de la aromatasa (tal como letrozol, anastrozol, o exemestano), anti-estrógeno (por ej. fulvestrant o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, pemetrexed, methotrexato, liposomal doxorubicina, doxorubicina liposómica pegilada, capecitabina, gemcitabina, meltalina, doxorubicina, vincristina, inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), o esteroide (por ej., dexametasona y prednisona). (por ej., realizaciones que conllevan el tratamiento de t(4;14)+ mieloma múltiple, dexametasona y lenalidomida, o dexametasona, o se combina bortezomib, o vincristina, doxorubicina y dexametasona, o talidomida y dexametasona, o doxorubicina liposómica, vincristina y dexametasona, o lenalidomida y dexametasona, o bortezomib y dexametasona, o bortezomib, doxorubicina y dexametasona, (por ej., realizaciones que incluyen el cáncer de vejiga), gemcitabina y cisplatino, o se combina un taxano (por ej., paclitaxel, docetaxel), o pemetrexed, o metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino, o carboplatino, o mitomicina C en combinación con 5-Fluorouracilo, o cisplatino, o cisplatino y 5-Fluorouracilo.

Formulaciones, Dosis y Administraciones

Los agentes terapéuticos utilizados en la invención se formulan, dosifican y administran de manera compatible con la práctica médica cabal. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno específico en tratamiento, el sujeto específico en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el régimen administración, la interacción droga droga de los agentes a combinar y otros factores conocidos por los facultativos médicos.

Las formulaciones terapéuticas se preparan utilizando métodos standard conocidos en la técnica mezclando el ingrediente activo con el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (20^a edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Los vehículos aceptables incluyen salina o buffers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina;

monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, mannososa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™, o PEG.

Opcionalmente, aunque preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro de sodio y preferentemente en concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración de conservante está en el rango de 0,1 a 2,0%, generalmente v/v. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en la técnica farmacéutica. Los conservantes preferidos son alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable en una concentración de 0,005 a 0,02%.

La formulación de la presente puede comprender asimismo más de un compuesto activo que sea necesario para la indicación específica en tratamiento, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades efectivas para el fin pretendido.

También se pueden atrapar los ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de drogas (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas han sido descritas en la obra antes citada Remington's Pharmaceutical Sciences.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se cuentan matrices semipermeables de polímero hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos formados, por ej., películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se cuentan los poliésteres, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de los Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etileno-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico

tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Si bien los polímeros tales como etileno-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas en el curso de más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un período prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a la pérdida de actividad biológica y a posibles cambios de la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo en cuestión. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces intermoleculares S-S por medio de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Los agentes terapéuticos de la invención se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos tales como administración endovenosa tal como bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. También se puede emplear una estrategia ex vivo para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias ex vivo conllevan la transfección o transducción de las células obtenidas de un polinucleótido que codifica un antagonista de FGFR3. A continuación se reintegran las células transfectadas o transducidas al sujeto. Las células pueden ser de cualquiera de una amplia gama de tipos entre los que se incluyen, aunque no a título de limitación, las células hematopoyéticas (por ej., células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista del FGFR3 es un anticuerpo, el anticuerpo es administrado por cualquier vía adecuada incluyendo la parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, en caso de ser conveniente para el tratamiento inmunosupresivo local, la administración intralesional. Las infusiones parenteral incluyen la administración intramuscular, endovenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión de pulsos, especialmente con dosis decrecientes del

anticuerpo. Preferentemente la dosificación se administra por medio de inyecciones, muy preferentemente inyecciones endovenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

En otro ejemplo, se administra el compuesto antagonista del FGFR3 en forma local, por ej., mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o ubicación del tumor lo permite y se pueden repetir periódicamente las inyecciones. El antagonista del FGFR3 se puede administrar asimismo por vía sistémica al sujeto o directamente a las células tumorales, por ej., a un tumor o al lecho de un tumor después de la escisión quirúrgica del tumor, a fin de impedir o reducir la recidiva local o metástasis.

La administración de los agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo típicamente en el curso de un período de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La terapia combinatoria está destinada a abarcar la administración de estos agentes terapéuticos en forma sucesiva, es decir donde cada agente terapéutico es administrado en un momento diferente, como así también la administración de estos agentes terapéuticos, o por lo menos dos de los agentes terapéuticos, en forma sustancialmente simultánea.

El agente terapéutico puede ser administrado por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo anti-FGFR3 incluido en la combinación puede ser administrada por inyección endovenosa, en tanto que se puede administrar el agente quimioterapéutico incluido en la combinación por vía oral. Por otro lado, por ejemplo, los dos agentes terapéuticos pueden ser administrados por vía oral, o se pueden administrar ambos agentes terapéuticos por inyección endovenosa, dependiendo de los agentes terapéuticos específicos. El orden en el cual se administran los agentes terapéuticos también varía dependiendo de los agentes específicos.

Dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una cantidad de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg de cada agente terapéutico es una dosis posible inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría estar en el rango de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes citados. En el caso de administraciones repetidas en el curso de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que el cáncer haya sido tratado, según

determinación por los métodos antes descriptos., pueden ser de utilidad otros regímenes de dosificación.

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

Artículos de Fabricación

En otro aspecto de la invención, se presenta un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos antes descriptos. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador o prospecto del envase adherido o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos-ampolla, jeringas, etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que en sí o combinada con otra composición (o composiciones) es eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la condición y puede presentar una boca de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa para solución endovenosa o un frasco ampolla con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. El marcador o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección, tal como el cáncer. Más aun, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, donde la composición comprende otro agente citotóxico. El artículo de fabricación de esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpos se pueden utilizar para tratar una condición específica, por ej., el cáncer. Por otro lado, o además, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), salina con buffer de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales convenientes desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen buffers diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se ha de entender que se pueden poner en práctica diversas realizaciones más, presentadas en la descripción general antes expuesta.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Líneas celulares y cultivo celular

Se obtuvo la línea celular RT4 de la American Type Cell Culture Collection. Las líneas celulares RT112, OPM2 y Ba/F3 fueron adquiridas a la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, (Germany)). La línea celular de mieloma múltiple KMS11 fue amablemente suministrada por el Dr. Takemi Otsuki de Kawasaki Medical School (Japón). La línea celular de cáncer de vejiga TCC-97-7 fue una donación generosa de la Dra. Margaret Knowles de St James's University Hospital (Leeds, RU). La línea celular UMUC-14 fue obtenida del Dr. H.B. Grossman (actualmente en el M.D. Anderson Cancer Center, de la Universidad de Texas, TX). Se mantuvo a las células con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (Sigma), 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina y L-glutamina en condiciones de CO_2 al 5% a 37°C.

Estudios de dimerización de FGFR3^{S249C}

Se cultivaron células UMUC-14 en medio sin cisteína, se las trató con R3Mab o DTNB por espacio de 3 h y se sometió a los lisados celulares a análisis de inmunotransferencia en condiciones reductoras o no reductoras. Para los estudios de dimerización in vitro, se clonó FGFR3-IIIb^{S249C} (residuos 143-374) en el vector pAcGP67A y se lo expresó en células T.ni Pro. Se purificó la proteína recombinante a través de una columna Ni-NTA seguida por una columna Superdex S200. Se eluyó el FGFR3^{S249C} dimerica en Tris 25 mM (pH 7,5) y 300 NaCl mM. Se incubó R3Mab (1 μM) con el dímero FGFR3^{S249C} (0,1 μM) a 37°C en las siguientes condiciones: KH_2PO_4 100 mM (pH 7,5), DTT 25 μM , EDTA 1 mM y 0,75 mg/ml de BSA. Se tomaron alícuotas de la reacción en los puntos de tiempo indicados y se detuvo la reacción agregando el buffer de muestra sin β -mercaptoetanol. Se analizó el Dímero-monómero mediante inmunotransferencia.

Estudios de Xenoinjerto

Todos los estudios fueron aprobados por el Genentech's Institutional Animal Care and Use Committee. Se adquirieron ratones nu/nu hembra o CB17 con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), de 6-8 semanas de edad a Charles River Laboratory (Hollister, CA). Se obtuvieron ratones desnudos atímicos hembra del National Cancer Institute-Frederick Cancer Center. Se mantuvo a los ratones en

condiciones específicas libres de patógenos. Se implantaron células RT112 ARNsh estables (7×10^6), células RT112 (7×10^6), Ba/F3-FGFR3^{S249C} (5×10^6), OPM2 (15×10^6), o KMS11 (20×10^6) por vía subcutánea en el flanco de los ratones en un volumen de 0,2 ml en HBSS/matrigel (1:1 v/v, BD Biosciences). Se implantaron células UMUC-14 (5×10^6) sin matrigel. Se midieron los tumores dos veces por semana empleando un calibre y se calculó el volumen de los tumores empleando la fórmula: $V=0.5 \times a \times b^2$, en la cual a y b representan la longitud y el ancho del tumor, respectivamente. Cuando el volumen medio del tumor llegó a 150–200 mm³, se asignó a los ratones aleatoriamente a grupos de 10 y se los trató dos veces por semana con una inyección intraperitoneal (i.p) de R3Mab (0,3–50 mg/kg), o una IgG1 humana control diluida en HBSS. Se dio a los animales control vehículo (HBSS) solo.

Estadísticas

Los datos agrupados se expresan en términos de media $\pm$ SEM. Se utilizaron pruebas t de Student apareadas (de 2 colas) para la comparación entre dos grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$ en todos los experimentos.

Generación de células estables FGFR3 ARNsh

Se clonaron tres FGFR3 ARNsh independientes en el vector pHUSH de acuerdo con lo descrito (1). La secuencia correspondiente a FGFR3 ARNshs utilizada en los estudios es la siguiente: ARNsh2: 5'GATCCCCGCATCAAGCTGCGGCATCATTCAAGAGATGATGCCGCAGCTTGATGCTTTTGGAAA (SEC ID NO: 192); ARNsh4: 5'–GATCCCCTGCACAACCTCGACTACTA

TTCAAGAGATAGTAGTCGAGGTTGTGCATTTTTTGGAAA–3' (SEC ID NO: 193); ARNsh6: 5'–GATCCCCAACCTCGACTACTACAAGATTCAAGAGATCTTGTAGTAGTCGAGGTTTTTTTGGAAA–3' (SEC ID NO: 194). Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación. El ARNsh control de EGFP fue descrito en nuestro estudio anterior (50). Se produjo el ARNsh que contenía el retrovirus cotransfectando células de empaque GP2–293 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) con construcciones VSV–G (Clontech Laboratories) y pHUSH–FGFR3 ARNsh y se cosecharon los sobrenadantes virales 72 h después de la transfección y se eliminaron todos los desechos por centrifugación para el experimento de transducción.

Se mantuvo a las células RT112 en medio RPMI 1640 que contenía FBS libre de tetraciclina (Clontech Laboratories) y se las transdujo con sobrenadante retroviral

en presencia de 4 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno. 72 Horas después de la infección se agregaron 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (Clontech Laboratories) al medio para seleccionar clones estables que expresaban ARNsh. Se aislaron las células estables, se las trató con 0,1 o 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxíciclina (Clontech Laboratories) por espacio de 4 días y se evaluó la reducción inducible de la expresión de la proteína FGFR3 por análisis de Western blotting. Se llevaron a cabo análisis del ciclo celular de acuerdo con lo descrito (51).

Selección de anticuerpos por fagos específicos para FGFR3

Se utilizaron bibliotecas de anticuerpo humanos de fagos con diversidades sintéticas en las regiones determinantes de la complementariedad seleccionadas (H1, H2, H3, L3), imitando la diversidad natural del repertorio de IgG humana para el panning. Se exhibieron los fragmentos Fab en forma bivalente en la superficie de las partículas de bacteriófago M13 (52). Se utilizaron IgD2–D3 de FGFR3–IIIb e IIIc humanos con marca identificatoria de His como antígenos. Se revistieron inmunoplaacas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc) de un día para otro a 4°C con la proteína FGFR3–IIIb–His o la proteína FGFR3–IIIC–His (10 $\mu\text{g/ml}$) y las bloqueó durante 1 hora con buffer PBST (PBS con Tween 20 al 0,05%) suplementado con BSA al 1%. Se agregaron bibliotecas de fagos de anticuerpos y se las incubó de un día para otro a temperatura ambiente (TA). Se lavaron las placas con buffer PBST y se eluyó el fago unido con HCl 50mM y NaCl 500 mM por espacio de 30 minutos y se lo neutralizó con un volumen igual de base Tris 1M. Se amplificaron los fagos recuperados en células azules de E. coli XL–1. Durante las rondas de selección subsiguientes se redujo el tiempo de incubación de los anticuerpos de fagos a 2 horas y se aumentó gradualmente la rigurosidad de lavado de las placas (53). Se identificaron anticuerpos de fagos únicos y específicos que se unen tanto a la isoforma IIIb como IIIc de FGFR3 por ELISA de fagos y secuenciación de ADN. De los 400 clones analizados, se seleccionaron cuatro para reformatearlos a IgGs de longitud total clonando las regiones VL y VH de los clones individuales en vectores LPG3 y LPG4, respectivamente, expresados transitoriamente en células de mamífero y purificados con columnas de proteína A (54). Se seleccionó el Clon 184.6 para la maduración de la afinidad.

Para la maduración de la afinidad, el fagomida que exhibía Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M13 (52) sirvió como modelo de la biblioteca para injertar los dominios variables de cadena liviana (VL) y cadena pesada (VH) del fago Ab. Se incorporaron los codones de terminación en CDR–L3. Se adoptó una estrategia de aleatorización blanda para la maduración de la afinidad de acuerdo con lo descrito

(53). Se seleccionaron dos combinaciones diferentes de bucles de CDR, H1/H2/L3, H3/L3, o L1/L2/L3 para la aleatorización. Para seleccionar los clones con afinidad madurada, se clasificaron las bibliotecas de fagos contra la proteína FGFR3 IIIb o IIIc-His, se las sometió a clasificación en placa para la primera ronda y se continuó con cuatro rondas de clasificación en fase de solución de acuerdo con lo descrito (52). Después de cinco rondas de paneo, se empleó un ELISA de fagos competitivo para seleccionar rápidamente los clones de alta afinidad de acuerdo con lo descrito (55). Se eligieron los clones con baja relación de absorbancia a 450 nm en presencia de FGFR3-His 10 nM a la absorbancia en ausencia de FGFR3-His para continuar con su caracterización.

Los clones 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 y 184.6.92 redujeron significativamente la viabilidad de las líneas celulares Ba/F3-FGFR3-IIIb, Ba/F3-FGFR3-IIIc y Ba/F3-FGFR3-S249C y el clon 184.6.52 redujo significativamente la viabilidad de la línea celular Ba/F3-FGFR3-S249C. La actividad inhibitoria incrementada estuvo osciló de aproximadamente 50 veces (clon 184.6.52) a aproximadamente 100 veces (clones 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 y 184.6.92) superior a la del clon 184.6, dependiendo de la línea celular analizada. Se determinó la cinética de unión de los clones 184.6.1, 184.6.58 y 184.6.62 to FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc utilizando BIAcore de la siguiente manera:

	FGFR3-IIIb KD (M)	FGFR3-IIIc KD (M)
184.6	3.80E-08	1.10E-07
184.6.1	2.64E-10	1.44E-09
184.6.58	1.90E-10	8.80E-10
184.6.62	1.20E-10	2.24E-09

Los clones 184.6.1, 184.6.58 y 184.6.62 también exhibieron inhibición mejorada de FGFR3 secuencia abajo con respecto a la señalización en las células Ba/F3-FGFR3, las células RT112 y las células OPM2.

Se seleccionó el Clon 184.6.1. Se introdujo una modificación de la secuencia, N54S, en el HVR H2 en el residuo 54, para mejorar la aptitud para la elaboración, generando el clon 184.6.1N54S. Los clones 184.6.1 y 184.6.1N54S exhibieron cinética de unión comparable (medida en ensayos Biacore) y actividad comparable en el ensayo de viabilidad de células Ba/F3. Se generaron otras variantes de HVR H2: se introdujo N54S en el clon 184.6.58 y N54G, N54A, o N54Q en el clon 184.6.1 y

184.6.58. Estos clones exhibieron actividad comparable en el ensayo de viabilidad de las células Ba/F3 con los clones parentales 184.6.1 o 184.6.58.

Se introdujo otra modificación de secuencia, D30E, en el HVR L1 del clon 184.6.1N54S, generando el clon 184.6.1NSD30E. El clon 184.6.1NSD30E y el clon 184.6.1N54S exhibieron cinética de unión comparable y actividad comparable en el ensayo de viabilidad de las células BA/F3 con los clones parentales 184.6.1 o 184.6.58.

En el presente contexto, "R3 Mab" se refiere a los clones del anticuerpo anti-FGFR3 184.6.1N54S, 184.6.1, o 184.6. Se utilizó el clon 184.6.1N54S en las figuras y experimentos que mencionan "R3Mab", excepto en los experimentos que arrojaron los resultados expuestos en las siguientes figuras (en las cuales el anticuerpo está indicado entre paréntesis): Figuras 9B (clon 184.6.1), 10 (clon 184.6), 11A and B (clon 184.6), 13 (clon 184.6.1), 14A (clon 184.6.1), 14B, G y H (clon 184.6), 19 (clone 184.6.1) y 22B y C (clon 184.6.1).

Análisis BIAcore /Resonancia de Plasmón Superficial (SRP) para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos

Se midieron las afinidades de unión de R3Mab a FGFR3 mediante Biacore /SRP utilizando un instrumento BIAcore™-3000 de acuerdo con lo descrito (53) con las siguientes modificaciones. Se aplicó un revestimiento de R3Mab directamente sobre chips biosensores CM5 para obtener aproximadamente 400 unidades de respuesta (RU). Para la medición cinética, se inyectaron diluciones en serie al doble de la proteína FGFR3-IIIb o IIIc-His (comenzando a 67 nM) en buffer PBST a 25°C con un caudal volumétrico de 30 μ l/minuto. Se calcularon los coeficientes de asociación (Kon, por mol/s) y disociación (Koff, por s) empleando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (Software de Evaluación BIAcore versión 3.2). Se calculó la constante de disociación (Kd, por mol) en términos de relación de Koff / Kon.

Se midieron las afinidades de unión de los anticuerpos por hibridoma de ratón para FGFR3 mediante Biacore/SRP de la siguiente manera. Se acopló FGFR3-IIIb o IIIc Humano a tres celdas de flujo diferentes (FC), FC2, FC3 y FC4, de un chip sensor BIACORE™ CM5 para obtener las unidades de respuesta (RU) de aproximadamente 50 RU. Se obtuvo la inmovilización mediante acoplamiento al azar a través de grupos amino empleando un protocolo provisto por el fabricante. Se registraron los sensogramas correspondientes a la unión de la IgG murina anti-FGFR3 derivada por hibridoma o el fragmento Fab a estas superficies a 25°C mediante inyección de una

serie de soluciones en el rango de 250 nM a 0,48 nM en incrementos al doble a un caudal volumétrico de 30 μ l/min. Entre inyección e inyección, cada inyección, se incluyó Glicina-HCl pH 1,7 10mM como buffer para regenerar el chip sensor. Se restó la señal de la celda de referencia (FC1) del sensograma observado en FC2, FC3 y FC4. Se calcularon las constantes cinéticas mediante ajuste de los datos por regresión no lineal de acuerdo con un modelo de unión 1:1 de Langmuir utilizando el software de evaluación BIAcore (versión 3.2) provisto por el fabricante.

Estudios de unión por ELISA B

Se clonaron los ADNc que codificaban los dominios extracelulares (ECD) de FGFR1-IIIb, IIIc, FGFR2-IIIb y IIIc, FGFR3-IIIb y IIIc y FGFR4 humanos en el vector basado en pRK para generar proteínas quiméricas de Fc de FGFR humano. Se produjeron las proteínas recombinantes mediante la transfección transitoria de células de ovario de hámster china (CHO) y se las purificó por cromatografía de afinidad de proteína A. Para evaluar la unión de los anticuerpos a los FGFRs, humanos, se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) de un día para otro a 4°C con 50 μ l de proteínas quiméricas FGFR ECD-Fc humano a razón de 2 μ g/ml. Después del bloqueo con salina con buffer de fosfato (PBS)/ BSA al 3%, se agregó el anticuerpo FGFR3 y se lo incubó a TA por espacio de 2 horas. Se detectó el anticuerpo FGFR3 unido específicamente utilizando un Fab anti-humano conjugado a HRP y el sustrato colorigénico de TMB peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD).

Para analizar el efecto de anticuerpos FGFR3 en la interacción FGF/FGFR3, se capturaron proteínas quiméricas FGFR3-Fc en una placa Maxisorp revestida con un anticuerpo específico del fragmento Fc γ de inmunoglobulina antihumana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Después del lavado, se agregaron cantidades crecientes del anticuerpo FGFR3 a la placa y se la incubó por espacio de 30 minutos. A continuación, se agregó FGF1 o FGF9 y heparina para la incubación a TA por espacio de 2 horas. Se lavaron las placas y se las incubó durante 1 hora con anticuerpo policlonal biotinilado específico de FGF1 (BAF232) o anticuerpo FGF9 biotinilado (BAF273, R&D Systems), y luego se procedió a la detección con estreptavidina-HRP y TMB.

Generación de células estables Ba/F3-FGFR3

Se clonó ADNc que codifica FGFR3 IIIb o IIIc humano de cadena completa en el vector pQCXIP (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) para generar pQCXIP-FGFR3-IIIb o IIIc. Se introdujeron mutaciones específicas, es decir, R248C, S249C,

G372C, Y375C y K652E, en el ADNc por medio de QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA). Para generar células estables Ba/F3 que expresaban el FGFR3 de tipo salvaje o mutante, se cotransfectaron diversas construcciones pQCXIP-FGFR3 en las células de empaque GP2-293 con plásmido VSV-G (Clontech Laboratories). Después de la selección con 2 µg/ml de puromicina durante dos semanas, se tiñeron las células que expresaban FGFR3 de tipo salvaje o mutante con FGFR3 mAb antihumano conjugado a Ficoeritrina (FAB766P, R&D Systems) y se las seleccionó por medio de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para los ensayos funcionales. Para el análisis de proliferación celular en una placa microtituladora de 96 pocillos, se utilizó la siguiente densidad celular: En el caso de las células que expresaban FGFR3-IIlb y FGFR3-K652E de tipo salvaje: 5.000 células/pocillo; en el resto: 10.000 células/pocillo. Se sembraron las células en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 10 ng/ml de FGF1 más 10 µg/ml de heparina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se agregó R3Mab en la concentración indicada y se adicionaron anticuerpo FGFR3 por hibridoma a razón de 2000 a 0,49 ng/ml (en diluciones en serie a cuatro veces) en el experimento con FGFR3-IIlb y 5000 a 1.2 ng/ml (en diluciones en serie a cuatro veces) en el experimento con FGFR3-IIlc. Después de 72 horas de incubación, se evaluó la viabilidad de las células con CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI).

Ensayo de Proliferación Celular

En el caso de los ensayos de proliferación correspondientes a las células RT112, RT4 y TCC-97-7, se sembraron 3000 células /pocillo en una placa microtituladora de 96 pocillos y se las dejó adherirse de un día para otro. A continuación se reemplazó el medio con medio con bajo contenido de suero (0,5% de FBS) con control o R3Mab en las concentraciones indicadas. Al cabo de 4 días de incubación, se agregó 1µCi de [Metil-³H] timidina (PerkinElmer, Waltham, MA) a cada pocillo y se lo incubó durante 1 horas más. Se transfirieron las células a filtros UniFilters utilizando una Cosechadora Packard Filtermate y se incorporó [³H]-timidina en el ADN genómico de las células en cultivo utilizando TopCount (PerkinElmer). En algunos casos, se evaluó la viabilidad de las células con CellTiter-Glo (Promega) después de la incubación con los anticuerpos durante 4 días. Se presentaron los valores en términos de +/- SE de cuadrupletes.

Ensayo de cultivo de los clones

Se evaluó el efecto de R3Mab sobre la clonogenicidad celular siguiendo un protocolo antes descrito (50). En pocas palabras, se sembraron 400 Células UMUC-14 en una placa de 6 pocillos en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino para permitir la adhesión de un día para otro. A continuación se agregó R3Mab o anticuerpo control en 0,1% de medio BSA hasta obtener una concentración final de 10 µg/ml. Se utilizó cada volumen igual de medio BSA al 0,1% solo (Simulado) como control adicional. Se incubaron las células durante aproximadamente 12 días hasta que las células de los grupos control formaran grandes colonias. Se colorearon las colonias con violeta cristal con 0,5% y se cuantificó el número y tamaño de colonias utilizando GelCount (Oxford, UK). Se presentó el número de colonias con un tamaño superior a 120 µm de diámetro en términos de media $\pm$ SEM (n=12).

Análisis de Inmunoprecipitación e inmunotransferencia

Para estudiar el efecto de anticuerpos sobre la señalización del FGFR3, Se privó a las células en medio libre de suero de un día para otro antes del comienzo del tratamiento. Las células fueron incubadas con anticuerpos diluidos en BSA al 0,1% (p/v), medio RPMI 1640, o con medio de BSA al 0,1% solo (Simulado). Al cabo de 3 horas a 37°C, se agregó FGF1 (concentración final de 15 ng/ml) y heparina (concentración final de 5–10 µg/ml) a la mitad de las muestras. Como controles, se agregó un volumen similar de heparina sola a la otra mitad de las muestras. Se continuó la incubación durante 10 min. Se retiraron los sobrenadantes por aspiración y se lavaron las células con PBS helado, luego se las sometió a lisis en buffer RIPA (Upstate, Charlottesville, VA) suplementado con ortovanadato de sodio 1 mM y cocktail de inhibidores de la proteasa Complete (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Se separaron los materiales insolubles de los lisados por centrifugación.

Se inmunoprecipitó el FGFR3 empleando un anticuerpo policlonal de conejo (sc-123, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y se lo analizó por electroforesis en gel de dodecil-poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE) y Western blot. Se evaluó el FGFR3 fosforilado con un anticuerpo monoclonal contra fosfo-tirosina (4G10, Upstate). Se sondeó el FGFR3 total con un anticuerpo monoclonal contra FGFR3 (sc-13121, Santa Cruz Biotechnology). Se analizó por sonda la fosforilación y activación de la señalización de la vía del FGFR3 utilizando los siguientes anticuerpos: se obtuvo anti-FGFR^{Y653/654}, anti-FRS2 α ^{Y196}, anti-fosfo-p44/42 MAPK^{T202/Y204}, anti-p44/42 MAPK total y anti-AKT^{S473} de Cell Signaling Technology (Danvers, MA) y se adquirió anti-FRS2 α total (sc-8318) a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se

visualizaron las transferencias utilizando sustrato quimioluminiscente (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Mapeó de epítopes de los Anticuerpos

Para determinar el epítipo de R3Mab, se sintetizaron 13 péptidos traslapados, cada uno de ellos de 15 aminoácidos de longitud, para cubrir el dominio extracelular del FGFR3 humanos desde los residuos 138 a 310. Se biotinilaron los péptidos en el término C en placas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL) de un día para otro. Después del bloqueo con PBS/ BSA al 3%, se incubaron las placas con R3Mab y se lo detectó utilizando una IgG antihumana conjugada a HRP (Jackson Immunoresearch) y el sustrato cromogénico TMB peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD).

Se analizaron anticuerpos de hibridoma FGFR3 antihumanos de ratón 1G6, 6G1 y 15B2 en el ensayo ELISA a fin de identificar sus epítopes de unión. 1G6, 6G1 y 15B2 se unen al FGFR3 humano IgD2-IgD3 (ambas isoformas IIIb y IIIc), en tanto que 5B8 sólo se une a IgD2-IgD3 del FGFR3-IIIb humano. En un ensayo de competencia, 1G6, 6G1 y 15B2 compitieron entre sí para unirse al FGFR3 humano, lo que sugirió que 1G6, 6G1 y 15B2 tienen epítopes traslapados. Ninguno de los anticuerpos de hibridoma compitió con el anticuerpo de fago 184.6, lo que indicó que los anticuerpos de hibridoma tienen uno o más epítopes diferenciados de 184.6.

Preparation and molecular cloning of mouse anticuerpos anti-FGFR3 1G6, 6G1 y 15B2

Se inmunizaron ratones BALB/c 12 veces con 2,0 µg de quimeras FGFR3-IIIb (rhFGFR3 (IIIb)/Fc, de R&D Systems, # de catálogo 1264-FR, lote # CYH025011, o con 2,0 µg de quimeras FGFR3-IIIc (rhFGFR3 (IIIc)/Fc, de R&D Systems, # de catálogo 766-FR, lote # CWZ055041, resuspendido en adyuvante lípido de monofosforilo A/ /trehalosa dicorinomicolato (Corixa, Hamilton, MT) en cada almohadilla plantar dos veces por semana. Tres días después del refuerzo final, se fusionaron los nódulos linfáticos con la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag.U.1, por electrofusión (Hybrimune, Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, Maryland). Se seleccionaron las células fusionadas de hibridoma del nódulo poplíteo o células de mieloma no fusionadas utilizando sección con hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) en Medio D del kit de selección de hibridoma ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá). En un principio se analizaron los sobrenadantes del cultivo para determinar su capacidad para unirse a FGFR3-IIIb y FGFR3-IIIc por ELISA y seguidamente se analizaron los hibridomas de interés para

determinar su capacidad para la tinción por FACS en células transfectadas FGFR3-IIIb Ba/F y Ba/F control, como así también la actividad del bloqueo del anticuerpo. A continuación se clonaron los hibridomas seleccionados limitando la dilución.

Se extrajo ARN total de las células de hibridoma produciendo el anticuerpo monoclonal FGFRIII anti humano 1G6 y 15B2, utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Alemania). Se amplificaron los dominios variable liviano (VL) y variable pesado (VH) utilizando RT-PCR con los siguientes cebadores degenerados:

1G6:

Directo de cadena liviana (LC): 5'–

GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCWGC–3' (SEC ID NO: 195)

Directo de cadena pesada (HC):

5'–GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG–3' (SEC ID NO: 196)

6G1:

Directo de cadena liviana (LC): 5'–GTCAGATATCGTGCTGACMCARTCTCC–3' (SEC ID NO: 197)

Directo de cadena pesada (HC): 5'–

GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG–3' (SEC ID NO: 198)

15B2:

Directo de cadena liviana (LC): 5'–GTACGATATCCAGATGACMCARTCTCC–3' (SEC ID NO: 199)

Directo de cadena pesada (HC): 5'–

GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG–3' (SEC ID NO: 200)

Los cebadores inversos de Cadena liviana y Cadena pesada para los tres clones fueron los siguientes:

Inverso de cadena liviana: 5'–TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC–3' (SEC ID NO: 201)

Inverso de cadena pesada: 5'–

ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT–3' (SEC ID NO: 202).

Los cebadores directos eran específicos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de las regiones VL y VH. Los cebadores inversos LC y HC fueron diseñados

para reasociarse a una región en el dominio constante liviano (CL) y el dominio constante pesado 1 (CH1), respectivamente, que están altamente conservados en toda la especie.

Se clonó el VL amplificado en un vector de expresión en células de mamífero pRK (Shields et al, (2000) J. Biol. Chem. 276:659) que contenía el dominio constante kappa humano. Se insertó el VH amplificado en un vector de expresión en células de mamífero que codificaba el dominio constante de IgG1 humana de longitud total. Se determinaron las secuencias de cadena pesada y liviana utilizando métodos convencionales.

Cristalización, determinación de estructura y refinación

Se clonó el FGFR3–IIIb ECD humano (residuos 143–374) en el vector pAcGP67A (BD Bioscience, San José, CA), producido en células T.ni Pro y se lo purificó empleando una columna Ni–NTA seguida por cromatografía de exclusión por tamaño. Se expresó el Fab R3Mab Fab en E.coli y se lo purificó sucesivamente en una columna de afinidad de proteína G, una columna SP sepharose y una columna Superdex 75. Se generó el complejo Fab–FGFR3 incubando el Fab con un exceso del ECD de FGFR3 ECD y a continuación se desglicosiló el complejo y se lo purificó en una columna de clasificación de tamaños Superdex–200 en TrisCl pH 7,5 20 mM y buffer de NaCl 200 mM. Se agruparon las fracciones que contenían el complejo y se las concentró a 20 mg/ml y se las utilizó en los ensayos de cristalización. Los cristales empleados en la determinación de las estructuras fueron cultivados a 4°C de la siguiente condición: cacodilato de sodio 0,1 M pH 6,5, MPD al 40% y PEG8000 al 5% utilizando el método de difusión de vapor. Se procesaron los datos utilizando HKL2000 y Scalepack (56). Se resolvió la estructura con el reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (57) y las coordenadas de 1RY3 (FGFR3) y 1N8Z (fragmento Fab). Se completó el modelo empleando el programa Coot (58) y se refinó la estructura a R/R_{sin} de 20,4%/24,3% con el programa Refmac (59). Se depositaron las coordenadas y los factores estructurales en el Protein Data Bank con el código de acceso 3GRW y también han sido descriptos en USSN 61/163,222, presentada el 25 de marzo de 2009, el contenido de la cual se incorpora a la presente como referencia.

Ensayo de ADCC

Se aislaron BMCs humanas por centrifugación por gradiente de Ficoll de sangre heparinizada y se midió la ADCC utilizando las líneas celulares de mieloma múltiple OPM2 o KMS11 o las líneas celulares de cáncer de vejiga RT112 o UMUC–14 como

objetivo y PBMCs como células efectoras a una relación de objetivo : efectoras 1:100. Se trataron las células objetivo (10.000 células/pocillo) con R3Mab o con IgG1 control humana por espacio de 4 horas a 37°C. Se determinó la citotoxicidad midiendo la liberación de LDH empleando el Ensayo de Integridad de Membrana Homogénea CytoTox–ONE siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Los resultados se expresan en términos de porcentaje de citólisis específica utilizando la fórmula: Citotoxicidad (%) = [(Lisis experimental – lisis espontánea experimental)/ (Lisis máxima objetivo – lisis espontánea objetivo)] x 100, donde la lisis espontánea es la citólisis no específica en ausencia del anticuerpo y la lisis máxima objetivo es inducida por Triton X–100 al 1%.

Resultados

Inducible ARNsh knockdown of FGFR3 attenuates cáncer de vejiga growth in vivo

Como preliminar para evaluar la importancia del FGFR3 para el desarrollo de tumores vesicales in vivo, examinamos el efecto de la reducción de la actividad de FGFR3 in vitro. Varios pequeños ARN pequeños de interferencia (si) de FGFR3 regularon a menos con eficacia el FGFR3 en las líneas celulares de cáncer de vejiga que expresaban el FGFR3 WT (tipo salvaje) (RT112, RT4, SW780) o mutante (UMUC–14, mutación S249C). La reducción de actividad de FGFR3 en las cuatro líneas celulares suprimieron acentuadamente la proliferación en cultivo (Figura 15). A continuación, generamos líneas celulares RT112 estables que expresaban ARNsh de FGFR3 inducible con doxíciclina. La inducción de tres ARNsh de FGFR3 independientes por doxíciclina disminuyó la expresión de FGFR3, en tanto que la inducción de un ARNsh control que tomaba como objetivo el EGFP no tuvo efecto alguno (Figura 7A). En ausencia de FGF exógeno, el tratamiento con doxíciclina redujo la incorporación de [³H]–timidina por las células que expresaban diferentes ARNsh de FGFR3, pero no el ARNsh control (Figura 7B), confirmando que la reducción de la actividad de FGFR3 inhibe la proliferación. El análisis adicional de las células RT112 con desarrollo exponencial reveló que la reducción de la actividad de FGFR3 durante un tratamiento de 72 h con doxíciclina redujo pronunciada y específicamente el porcentaje de células en las fases S y G2 del ciclo celular, con un consiguiente aumento de células en la fase G1 (Figura 7C). Se observó un efecto similar con dos ARNsh de FGFR3 más (Figura 16A). No se detectaron números

significativos de células con un contenido de ADN sub-diploide, lo que sugirió que no había cambios de niveles de apoptosis. Por ende, el efecto inhibitorio de la reducción de la actividad de FGFR3 sobre la proliferación de células RT112 se debe principalmente a la atenuación del progreso del ciclo celular.

A continuación evaluamos el efecto de la reducción de la activación de FGFR3 sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumores RT112 preestablecidos en ratones. La reducción de la actividad de FGFR3 suprimió sustancial y específicamente el desarrollo de tumores (Figura 7D, paneles superiores y Figura 16B). El análisis de las muestras de tumores el día 45 confirmó la Reducción de la actividad efectiva del FGFR3 tras la inducción de ARNsh de FGFR3 con doxiciclina en comparación con ARNsh control (Figura 7D, paneles inferiores). Estos resultados demuestran que el FGFR3 es de crucial importancia tanto in vitro como in vivo para el desarrollo de las células de cáncer de vejiga RT112.

Generación de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-FGFR3

Para estudiar más a fondo la importancia del FGFR3 en el desarrollo de tumores y explorar el potencial de este receptor como objetivo terapéutico, desarrollamos un anticuerpo monoclonal anti-FGFR3 antagonista (denominado R3Mab) usando una estrategia de exhibición de fagos. Seleccionamos este anticuerpo específico basándonos en su capacidad para bloquear tanto la unión al ligando como la dimerización por FGFR3 y su singular capacidad para inhibir no sólo el FGFR3 WT sino también los mutantes más prevalentes asociados al cáncer de este receptor (ver a continuación). R3Mab se dirige a los dominios extracelulares IgD2 y IgD3 de FGFR3, que son necesarios y suficientes para la unión a FGF (4). R3Mab se unió tanto a la isoforma IIIb como IIIc del FGFR3 humano, aunque no exhibió unión detectable a FGFR1, FGFR2 o FGFR4 (Figura 8A). El análisis Biacore indicó que R3Mab tenía una afinidad evidente similar por el FGFR3-IIIc murino, de mono cinomolgo y humano (no se ilustran datos). En la Tabla 2 se ilustra la afinidad de R3Mab por el FGFR3 humano.

Tabla 2. Afinidad de R3Mab por el FGFR3 humano determinado por análisis BIAcore.

ECD FGFR3 humano	Mab R3 capturado en chips		
	kon/(1/Ms)	koff(1/s)	Kd(M)
IIIb	1.80E+06	2.00E-04	1.11E-10
IIIc	9.10E+04	3.20E-04	3.52E-09

A continuación evaluamos la capacidad de R3Mab para bloquear la unión de FGFR3 a FGF1 y FGF9. R3Mab inhibió potentemente la unión de FGF1 a FGFR3–IIIb y –IIIc, con concentraciones inhibitorias medias–máximas (CI₅₀) de 0,3 nM y 1,7 nM, respectivamente (Figura 8B,C). Del mismo modo, R3Mab bloqueó eficientemente la unión de FGF9 a FGFR3–IIIb y –IIIc, con una CI₅₀ de 1,1 nM y 1,3 nM, respectivamente (Figura 8D,E).

R3Mab inhibe el FGFR3 WT y sus variantes mutantes más prevalentes asociados con el cáncer

Para estudiar si R3Mab inhibía la proliferación celular impulsada por el FGFR3 WT o mutante, aprovechamos la observación de que la expresión de FGFR3 ectópica en células murinas pro–B Ba/F3 confiere proliferación y supervivencia independiente de interleucina (IL)–3, dependiente de FGF1 (29). En ausencia de FGF1 e IL–3, las células Ba/F3 que expresaban de manera estable el FGFR3 WT no eran viables, en tanto que FGF1 potenció considerablemente su proliferación (Figura 9A). R3Mab bloqueó específicamente la proliferación de las células Ba/F3–FGFR3 estimulada por FGF1 en forma dependiente de la dosis (Figura 9A). A continuación evaluamos el impacto de R3Mab sobre la Señalización del FGFR3 en estas células. FGF1 indujo la fosforilación y activación de FGFR3 y la activación concomitante de p44/42 MAPK, en tanto que R3Mab suprimió con eficacia la activación de ambas moléculas (Figura 9B).

En el cáncer de vejiga, activación somática de las mutaciones en el cúmulo FGFR3 dentro de la región ligante entre IgD2 y IgD3, el dominio extracelular yuxtamembrana o el dominio de quinasas (Figura 9C). Las sustituciones extracelulares de sentido erróneo con mucha frecuencia dan origen a una cisteína no apareada, lo que lleva a la dimerización de FGFR3 independiente de ligandos. Estas mutaciones causan niveles acentuadamente diferentes de activación constitutiva de FGFR3,

posiblemente debido al impacto diferencial sobre la orientación del dominio citoplásmico de quinasa (30, 31). Las mutaciones más frecuentes son S249C, Y375C, R248C, G372C y K652E, que, juntas, constituyen el 98% de todas las mutaciones de FGFR3 en el cáncer de vejiga (32). Formulamos el razonamiento de que un agente terapéutico óptimo debería bloquear no sólo la proteína FGFR3 WT, que se sobreexpresa en ciertos cánceres, sino también los mutantes de FGFR3 más prevalentes asociados a tumores. Para evaluar más afondo el R3Mab, generamos líneas celulares Ba/F3 que expresaban de manera estable cada una de las cinco variantes FGFR3 mutantes más comunes. Todas las mutantes se expresaron en niveles similares en la superficie celular y las mutantes de cisteína se dimerizaron espontáneamente sin el ligando (no se ilustran datos). Las líneas celulares que expresaban diferentes mutantes de cisteína exhibieron una respuesta de crecimiento variable al FGF1, coincidiendo con los hallazgos anteriores (30, 31). Como ya se informara (33), las células que expresaban FGFR3^{R248C} exhibieron proliferación constitutiva, independiente del ligando y no respondían a FGF1 (Figura 9D). Del mismo modo, la mutación más frecuente, FGFR3^{S249C}, confirió proliferación independiente del ligando (Figura 9E). Notablemente, R3Mab suprimió la proliferación constitutiva impulsada por cualquiera de estos mutantes (Figura 9 D,E). Las células que expresaban las mutaciones de dominio yuxtamembrana FGFR3^{G372C} (Figura 9F) o FGFR3^{Y375C} (Figura 9G) requirieron FGF1 para la proliferación y su crecimiento fue bloqueado por completo por R3Mab. Las células que expresaban FGFR3^{K652E} exhibieron débil proliferación independiente del ligando y significativo desarrollo en respuesta al FGF1 (33). R3Mab no afectó la pobre actividad basal de FGFR3^{K652E} (no se ilustran datos), aunque casi abolió la proliferación inducida por el ligando mediada por este mutante (Figura 9H). Por ende, R3Mab tiene una singular capacidad para inhibir tanto el FGFR3 WT como los mutantes prevalentes asociados con el cáncer. Más aun, R3Mab no exhibió actividad agonista detectable.

En un esfuerzo independiente, generamos y caracterizamos múltiples anticuerpos de hibridoma FGFR3 anti-humanos de ratón. Ninguno de estos anticuerpos de hibridoma pudo inhibir todos los mutantes de FGFR3 ligados al cáncer que analizamos (Figura 17), ni tampoco compartieron sus epítopes traslapados con R3Mab.

Más aun, la totalidad de los anticuerpos de hibridoma exhibieron actividad agonista, estimulando potentemente la proliferación de mutantes de FGFR3 ligados al cáncer R248C y S249C y exhibieron cierta estimulación de la proliferación de los

mutantes Y375C y G370C. Los anticuerpos de hibridoma exhibieron niveles diferenciales de antagonismo y agonismo, dependiendo del mutante de FGFR3 analizado, a saber:

	1G6	6G1	15B2
FGFR3–IIIb tipo salvaje	inhibición	inhibición	inhibición
FGFR3–IIIb R248C	2X estimulación	4–5X estimulación	3–4X estimulación
FGFR3–IIIbS249C	2X estimulación	4–5X estimulación	4–5X estimulación
FGFR3–IIIb Y375C	1,2–1,5X estimulación	1,2–1,5X estimulación	1,2–1,5X estimulación
FGFR3–IIIb K652E	50% de inhibición	60–70% de inhibición	inhibición
FGFR3–IIIc	inhibición	inhibición	inhibición
FGFR3–IIIc G370C	Ningún efecto	20–30% de inhibición	10–2–% de inhibición

Por consiguiente, los anticuerpos de hibridoma exhibieron un efecto diferencial imprevisible sobre la proliferación celular de las células Ba/F3 impulsada por diversos mutantes de FGFR3.

Caracterización de anticuerpos de hibridoma FGFR3 anti-humanos de ratón

Los anticuerpos de hibridoma FGFR3 anti-humanos de ratón fueron caracterizados a su vez de la siguiente manera:

(1) En un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la unión de FGF1 a las isoformas humanas FGFR3–IIIb y IIIc, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 pudieron bloquear la unión de FGF1 a las isoformas humanas FGFR3–IIIb y IIIc en forma dependiente de la dosis. Cuando se realizaron análisis en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 2000 a 0,49 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF1 a FGFR3–IIIb con valores de CI50 de 0,69, 0,87 y 0,72 nM. Cuando se los analizó en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 5000 a 1,2 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF1 a FGFR3–IIIc con valores de CI50 de 0,57, 3,4 y 0,7 nM, respectivamente.

(2) En un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la unión de FGF9 a las isoformas humanas FGFR3–IIIb y IIIc, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon eficientemente la unión de FGF1 a las isoformas humanas FGFR3–IIIb y IIIc en forma dependiente de la dosis.

Cuando se realizaron análisis en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 2000 a 0,49 ng/m, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF9 a FGFR3–IIIb con valores de CI50 de 0,13, 0,16 y 0,07 nM, respectivamente. Cuando se realizaron análisis en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 5000 a 1.2 ng/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la unión de FGF9 a FGFR3–IIIc con valores de CI50 de 0,13, 0,11 y 0,07 nM, respectivamente.

(3) Se determinó la afinidad de unión de los anticuerpos de hibridoma murino anti–FGFR3 de longitud total 1G6, 6G1 and 15B2 empleando el análisis Biacore. Los resultados de este análisis están expuestos en la Tabla 3.

Tabla 3.

Anticuerpo	FGFR3–IIIB			FGFR3–IIIC		
	kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Kd (nM)	kon (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Kd (nM)
1G6 mIgG	2,2	3,1	1,4	2,2	2,8	1,3
6G1 mIgG	2,7	3,8	1,4	2,6	3,2	1,2
15B2 mIgG	4,1	29	7,1	3,5	39	11,1

(4) En un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti–FGFR3 para inhibir la proliferación de células Ba/F3 impulsadas por los anticuerpos humanos FGFR3–IIIb o IIIc, 1G6, 6G1 y 15B2 pudieron bloquear la proliferación de las células Ba/F3 impulsada por el FGFR3–IIIb o IIIc humano en forma dependiente de la dosis. Cuando se realizaron análisis en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 0,01 a 100 ug/ml, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 bloquearon la proliferación de las células Ba/F3 impulsada por FGFR3–IIIb con valores de CI50 de 3–5 nM, 3 nM y 6–8 nM, respectivamente y bloquearon la proliferación de las células Ba/F3 impulsada por FGFR3–IIIc con valores de CI50 de 10–35 nM, 24 nM y 60 nM, respectivamente.

(5) En un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti–FGFR3 para inhibir la señalización inducida por FGF1 en las células Ba/F3 que expresan el FGFR3–IIIb humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 pudieron bloquear la señalización inducida por FGF1 en las células Ba/F3 que expresan el FGFR3–IIIb humano en forma dependiente de la dosis cuando se los analizó en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 0,25

a 6,75 ug/ml. Se utilizaron 25 ng/ml de FGF1 en este experimento. En ausencia de FGF1, el tratamiento con anticuerpos no tuvo efecto alguno sobre la activación del FGFR3.

(6) En un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de hibridoma murino anti-FGFR3 para inhibir la señalización inducida por FGF1 en las células Ba/F3 que expresan FGFR3-IIIc humano, los anticuerpos 1G6, 6G1 y 15B2 pudieron bloquear la señalización inducida por FGF1 en las células Ba/F3 que expresan el FGFR3-IIIc humano en forma dependiente de la dosis cuando se los analizó en todo un rango de concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 0,25 a 6,75 ug/ml. En este experimento se utilizaron 25 ng/ml de FGF1. En ausencia de FGF1, el tratamiento con anticuerpos no tuvo efecto alguno sobre la activación del FGFR3.

Base estructural para la interacción de R3Mab con FGFR3

Para obtener cierto grado de conocimiento sobre el modo de interacción de los R3Mab con el FGFR3, sintetizamos una serie de 13 péptidos traslapados que abarcaban las regiones de FGFR3-IIIb IgD2 y D3 y se los analizó para determinar su unión a R3Mab. Los péptidos 3 (residuos 164–178) y 11 (residuos 269–283) exhibieron unión específica a R3Mab, entre los cuales el péptido 3 tuvo una interacción más potente (Figura 10A), indicando que las regiones correspondientes de FGFR3 son esenciales para el reconocimiento por R3Mab. Los estudios cristalográficos anteriores de FGFR1 en complejo con FGF2 identificaron residuos críticos del receptor implicados en la unión directa a FGF y heparina, como así también la dimerización del receptor (34). El alineamiento de los péptidos de FGFR3 3 y 11 con los sitios funcionalmente importantes del FGFR1 reveló que estos péptidos abarcan los correspondientes residuos FGFR1 esenciales para la unión directa a FGF2, la dimerización del receptor, como así también la interacción con heparina (Figura 10B). Estos datos indican que el epítipo de R3Mab en FGFR3 se traslapa con los residuos del receptor dedicados a la asociación de ligandos y a la interacción receptor–receptor.

A continuación cristalizamos el complejo entre el fragmento Fab de R3Mab y la región extracelular IgD2–D3 del FGFR3-IIIb humano y determinamos la estructura de rayos X a una resolución de 2,1Å (Figura 10 C, D; Tabla 4). En este complejo, aproximadamente 1400 Å² y 1500 Å² de las áreas superficiales accesibles al solvente están embutidas en el FGFR3 y el Fab, respectivamente. Aproximadamente 80% de la superficie embutida incluye IgD2, en tanto que el resto constituye el ligante y las regiones IgD3. En el lado del Fab del complejo, aproximadamente 40% de la interfaz embutida abarca la región determinante de la complementariedad (CDR)–H3, 20% de

CDR-H2, 20% de CDR-L2 y las contribuciones menores son de otras CDRs y residuos marco. Notablemente, los aminoácidos (AAs) de CDR-H3 forman dos cadenas β , que extienden la lámina β de IgD2 (Figura 10D). El Fab interactúa con los AAs que constituyen el sitio de unión a FGF de FGFR3, como así también residuos que forman la interfaz de dimerización del receptor, como se identificó anteriormente en diversos complejos diméricos FGF:FGFR (por ej., el código de PDB 1CVS, (34); y la Figura 10C, las áreas en gris/sombreado cuadriculado y gris oscuro). Las interfaces de interacción identificadas por cristalografía coincidieron totalmente con los datos basados en péptidos (Figura 18 A, B). Juntos, estos resultados revelan la manera en que R3Mab inhibe la unión al ligando y sugieren además que la unión de R3Mab a FGFR3 puede prevenir la dimerización del receptor. Los aminoácidos de FGFR3 que entran en contacto con R3Mab están expuestos en la Tabla 5. Las coordenadas cristalográficas correspondientes a esta estructura están depositados en el Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas) con el código de acceso 3GRW.

Tabla 4: Resumen del análisis cristalográfico

<u>Recolección de datos</u>	FGFR3-IIIb: R3Mab Fab
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de las células	a=58,5, b=99,3,c=143,7
Resolución (Å)	25–2,1
^a R _{sym}	0,098 (0,663) ^b
Número de observaciones	288498
Reflexiones únicas	49851
Grado de completud (%)	99,9 (100,0) ^b
Refinación	
Resolución (Å)	20–2,1
Número de reflexiones	46714
^c R ² Final, R _{libre} (F>0)	0,187, 0,224
Número de átomos no-H	5270
Número de aminoácidos	650
Sulfato	1
Azúcar	1
Átomos de solvente	274
Enlaces Rmsd (Å)	0,011
Ángulos Rmsd (°)	1,4

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

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

^c $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. R_{free} se calcula como R , aunque 5 % de las reflexiones están excluidas de toda refinación.

Tabla 5: Residuos de FGFR3 que están en contacto con R3Mab
Superficie embutida en el residuo de los residuos en la interfaz

THR 154	0.10
ARG 155	16.50
ARG 158	105.40
MET 159	6.00
LYS 161	52.50
LYS 162	1.70
LEU 163	12.30
LEU 164	55.10
ALA 165	10.10
VAL 166	10.60
PRO 167	45.50
ALA 168	22.60
ALA 169	63.60
ASN 170	75.40
THR 171	83.00
VAL 172	1.70
ARG 173	91.70
PHE 174	1.50
ARG 175	95.60
PRO 177	15.90

GLY 202 2.10
LYS 205 63.40
ARG 207 67.60
GLN 210 31.60
SER 212 0.40
VAL 214 26.40
GLU 216 48.90
SER 217 1.80
TYR 241 15.90
LEU 246 3.10
GLU 247 1.80
ARG 248 46.90
TYR 278 32.20
SER 279 1.80
ASP 280 19.80
ALA 281 3.00
GLN 282 24.80
PRO 283 0.50
SER 314 1.20
GLU 315 82.60
SER 316 33.20
VAL 317 56.60
GLU 318 51.50

Comparamos la estructura R3Mab–FGFR3 con una estructura publicada anteriormente de FGFR3–IIIc en complejo con FGF1 (4, 35) (Figura 10E, 10F). La superposición de los complejos anticuerpo–receptor y ligando–receptor reveló que no hay diferencias de conformación importantes dentro de los dominios individuales del receptor, excepto en la región que distingue a FGFR3–IIIc de FGFR3–IIIb; Sin embargo, la orientación de IgD3 con respecto a IgD2 fue drásticamente diferente

(Figura 10E, blanco y gris; Figura 10F, blanco y gris-malla). Dado que las posiciones relativas de IgD2 e IgD3 son críticas para la unión al ligando, la conformación alternativa adoptada por IgD3 tras la unión a R3Mab puede otorgar un mecanismo adicional para impedir la interacción del ligando con FGFR3.

R3Mab inhibe El FGFR3 endógeno WT y mutante en las células de cáncer de vejiga

Para evaluar si R3Mab podía suprimir la función del FGFR3 en las células de cáncer de vejiga, examinamos en primer lugar las líneas celulares RT112 y RT4, que expresan FGFR3 WT. R3Mab inhibió con potencia la incorporación de [^3H]-timidina por las células RT112 (Figura 11A) y ejerció una supresión significativa, aunque más moderada, de la proliferación de células RT4 (Figura 19A). Para investigar el efecto de R3Mab sobre la activación del FGFR3, examinamos la fosforilación del FGFR3 en células RT112. Coincidiendo con los resultados en células Ba/F3-FGFR3 (Figura 9B), R3Mab atenuó acentuadamente la fosforilación del FGFR3 inducida por FGF1 (Figura 11B). A continuación examinamos la fosforilación de FRS2 α , AKT y p44/42 MAPK, tres mediadores secuencia debajo de la señalización del FGFR3. FGF1 activó potentemente estas moléculas en las células RT112, en tanto que R3Mab disminuyó significativamente esta activación (Figura 11B). Del mismo modo, R3Mab suprimió la fosforilación inducida por FGF1 de FGFR3 y MAPK en las células RT4 (Figura 19B).

A continuación investigamos si R3Mab podía inhibir la activación de FGFR3 mutante endógeno en células de cáncer de vejiga humano. S249C es la mutación más frecuente de FGFR3 en el cáncer de vejiga (Figura 9C). Dos líneas celulares disponibles, UMUC-14 y TCC-97-7, acarrean un alelo FGFR3^{S249C} mutado (Ref. 36 y no se ilustran datos). Si bien R3Mab no afectó el crecimiento exponencial de las Células UMUC-14 en cultivo (no se ilustran datos), redujo significativamente el desarrollo clonal de estas células (Figura 11C). Específicamente, R3Mab redujo el número de colonias de más de 120 μm de diámetro aproximadamente en 77% en comparación con el anticuerpo control (Figura 11D). Más aun, R3Mab inhibió la incorporación de [^3H]-timidina por las células TCC-97-7 en cultivo (Figura 19C).

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

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

La capacidad de R3Mab para inhibir la señalización y proliferación constitutiva de FGFR3^{S249C} en las células de cáncer de vejiga fue asombrosa, teniendo en cuenta que este mutante puede sufrir la dimerización ligada por disulfuro, independiente de ligandos (26, 30). Para explorar la forma en que R3Mab inhibe el FGFR3^{S249C}, examinamos el efecto de R3Mab sobre el estado oligoméricos de este mutante en Células UMUC-14. En condiciones reductoras, FGFR3^{S249C} migró en forma de banda única de ~97 kDa, coincidiendo con el tamaño monomérico (Figura 12A). En condiciones no reductoras, en las células tratadas con el anticuerpo control apareció una fracción de gran tamaño de FGFR3^{S249C} en forma de banda de ~200 kDa, independientemente de la adición de FGF1, indicando un estado dímérico constitutivo (Figura 12A). El tratamiento con R3Mab redujo sustancialmente la cantidad de dímeros, con un aumento consiguiente de monómeros (Figura 12A). Sistemáticamente, R3Mab redujo el nivel de dímeros FGFR3^{S249C} en las células TCC-97-7 sin tener en cuenta el tratamiento con FGF1 (Figura 19E).

¿De qué manera reduce R3Mab los niveles de dímeros de FGFR3^{S249C} en las células de cáncer de vejiga? Una explicación potencial es que puede romper el dímero FGFR3^{S249C} mediante la internalización del FGFR3 inducida por el anticuerpo y el tráfico a través de endosomas o lisosomas. Analizamos esta posibilidad interviniendo farmacológicamente la endocitosis. De todas maneras R3Mab redujo la cantidad de dímero en las células UMUC-14 pretratadas con diversos inhibidores de la endocitosis, pese al bloqueo sustancial de la internalización del FGFR3^{S249C} (Figura 20 A, B). Por consiguiente, la alteración del dímero por R3Mab es independiente de la endocitosis. Otra explicación posible es que el FGFR3^{S249C} celular puede existir en un equilibrio dinámico monómero-dímero; en consecuencia, la unión de R3Mab al FGFR3^{S249C} monomérico es que podría impedir la formación de dímeros y, de esa manera, desplazar el equilibrio hacia el estado monomérico. Para examinar esta posibilidad, utilizamos el agente ácido 5,5'ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) que no penetra en las células, que reacciona selectivamente con los grupos sulfhidrilo de las cisteínas no apareadas y los bloquea (37). El tratamiento de las Células UMUC-14 con DTNB llevó a la acumulación de monómeros FGFR3^{S249C} en desmedro de los dímeros (Figura 12B), indicando que el FGFR3^{S249C} existe en un equilibrio dinámico entre monómeros y dímeros.

Para analizar si R3Mab afecta este equilibrio, generamos una proteína recombinante soluble que comprende los dominios IgD2-D3 de FGFR3^{S249C} y

aislamos los dímeros por cromatografía de exclusión por tamaños. Incubamos los dímeros con buffer o anticuerpos en presencia de una concentración muy baja de un agente reductor (25 μ M of DTT) y analizamos el estado oligomérico del receptor por SDS–PAGE en condiciones no reductoras. R3Mab aceleró significativamente la aparición de una banda de ~25 kDa que representa el monomérico FGFR3^{S249C} en desmedro del dímero de ~50 kDa, en comparación con el simulacro o los anticuerpos control (Figura 12C); en efecto, a las 2 h la reducción de los dímeros era sustancialmente más completa en presencia de R3Mab. Estos resultados indican que el R3Mab desplaza el equilibrio entre los estados monoméricos y diméricos de FGFR3^{S249C} a favor del monómero.

R3Mab no promueve la regulación a menos del FGFR3

Examinamos el efecto de R3Mab (clon 184.6.1) y los anticuerpos de hibridoma anti–FGFR3 sobre la regulación a menos del FGFR3 analizando la internalización del FGFR3 y la degradación del FGFR3 en las células tratadas con el anticuerpo. Se trataron las líneas celulares de cáncer de vejiga que expresaban el FGFR3 de tipo salvaje (RT112) o el FGFR3 mutado (S249C en TCC97–7) con R3Mab o los anticuerpos de hibridoma 1G6 o 6G1 por espacio de 4 a 24 horas, luego se cosecharon los lisados celulares para el análisis de western blot de los niveles totales de FGFR3. El tratamiento con R3 Mab no redujo los niveles de FGFR3, en tanto que el tratamiento con los mabs de hibridoma 1G6 y 6G1 redujo significativamente los niveles de FGFR3. Estos resultados sugirieron que R3Mab no promovía la regulación a menos de FGFR3, en tanto que los mabs 1G6 y 6G1 promovían efectivamente la internalización y regulación a menos del receptor FGFR3. En un experimento separado, se examinaron los niveles superficiales de FGFR3 empleando análisis de FACS. Al cabo de 24 horas de tratamiento con R3Mab (clon 184.6.1) de las Células UMUC–14 (que contenían la mutación FGFR3 S249C), se incrementaron levemente los niveles superficiales de FGFR3. Estos resultados demuestran que el tratamiento con R3Mab no promovió la regulación a menos del FGFR3.

R3Mab inhibe el crecimiento y señalización del FGFR3 en modelos de tumores múltiples

A continuación, examinamos el efecto de R3Mab sobre el crecimiento de las células de cáncer de vejiga in vivo. Inyectamos en ratones nu/nu células RT112 (que expresan FGFR3 WT), dejamos que los tumores crecieran hasta alcanzar un volumen medio de ~150 mm³ y administramos a los animales dosis de vehículo o R3Mab dos veces por semana. En comparación con el control con vehículo el día 27, el

tratamiento con R3Mab a razón de 5 o 50 mg/kg suprimió el desarrollo de tumores en aproximadamente 41% o 73% respectivamente (Figura 13A). El análisis de los lisados tumorales recolectados 48 h o 72 h después del tratamiento demostró que R3Mab reducía pronunciadamente el nivel de FRS2 α fosforilado (Figura 13B). Misteriosamente, los niveles totales de proteína FRS2 α también eran más bajos en los tumores tratados con R3Mab, sugiriendo que la inhibición del FGFR3 puede llevar además a la regulación a menos del FRS2 α . R3Mab redujo además la cantidad de MAPK fosforilado en tumores, sin afectar los niveles totales de MAPK (Figura 13B). Por consiguiente, R3Mab inhibe el desarrollo de xenoinjertos de tumores RT112 además de bloquear la señalización por el FGFR3 WT.

A continuación investigamos el efecto de R3Mab sobre el desarrollo de xenoinjertos que expresan el FGFR3 mutante. El tratamiento con R3Mab atenuó profundamente el progreso de los tumores Ba/F3–FGFR3^{S249C} (Figura 13C). Más aun, R3Mab inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de vejiga UMUC–14 (Figura 13D). Para evaluar si R3Mab afecta la activación de FGFR3^{S249C} in vivo, evaluamos el nivel de dímero FGFR3^{S249C} en lisados tumorales colectados 24 h o 72 h después del tratamiento. En condiciones no reductoras, la cantidad de dímero FGFR3^{S249C} fue sustancialmente más baja en los tumores tratados con R3Mab en comparación con el grupo control, en tanto que los niveles totales de FGFR3^{S249C}, valorados por la cantidad detectada en condiciones reductoras, exhibieron poco cambio (Figura 13E). No se observó acumulación evidente del monómero FGFR3^{S249C} en los lisados tumorales, a diferencia de los resultados obtenidos en cultivo celular (Figura 13E vs. 12A). Esto se podría deber a la débil sensibilidad de detección del FGFR3 monomérico en condiciones no reductoras por el anticuerpo policlonal de conejo anti–FGFR3 utilizado en este estudio (Figura 21). Como dato importante, R3Mab también inhibió significativamente la fosforilación y activación de MAPK en tumores UMUC–14 (Figura 13E), sugiriendo que R3Mab inhibe la actividad de FGFR3^{S249C} in vivo. No observamos ninguna pérdida significativa de peso ni otras anormalidades groseras en ninguno de los estudios in vivo. Más aun, en un estudio de seguridad que se llevó a cabo en ratones, el R3Mab, que se une con afinidad similar tanto el FGFR3 humano como de ratón, no ejerció toxicidad clara alguna en ningún órgano, incluyendo la vejiga (no se ilustran datos). Juntos, estos datos indican que múltiples exposiciones al R3Mab son bien toleradas en ratones.

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

Para evaluar si R3Mab podía albergar potencial terapéutico para el mieloma múltiple, analizamos en primer lugar el efecto de R3Mab sobre la proliferación y supervivencia de tres líneas celulares t(4;14)+ en cultivo. Las células UTM2-2 acarrean el FGFR3 WT, en tanto que OPM2 y KMS11 albergan una sustitución K650E y Y373C, respectivamente (7). En cultivo, R3Mab abolió por completo la proliferación de las células UTM2-2 inducida por FGF9 (Figura 22A). R3Mab inhibió moderadamente el crecimiento de las células OPM2, pero no tuvo efecto evidente alguno sobre la proliferación de células KMS11 (Figura 22 B, C). Dado que las células UTM2-2 no forman tumores en ratones, evaluamos la eficacia de R3Mab contra tumores OPM2 y KMS11. R3Mab abolió casi por completo el desarrollo de xenoinjertos de tumores de ambas líneas celulares (Figura 14 A, B).

La marcada diferencia de actividad de R3Mab contra las células tumorales OPM2 y KMS11 in vitro e in vivo sugirió la posibilidad de que R3Mab tenía la capacidad de sostener funciones efectoras inmunes mediadas por Fc contra estos tumores con sobreexpresión de FGFR3. Ambas líneas celulares expresan altos niveles de CD55 y CD59 (no se ilustran datos), dos inhibidores de la vía de los complementos; en consecuencia, no se observó citotoxicidad dependiente del complemento (no se ilustran datos). A continuación nos concentramos en la ADCC. La ADCC tiene lugar cuando un anticuerpo se une a su antígeno en una célula objetivo y a través de su Región Fc, entra en contacto con los receptores Fcγ (FcγRs) expresados en células efectoras inmunes (38). Para evaluar la ADCC in vitro, incubamos células KMS11 o OPM2 con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recién aisladas en presencia de R3Mab o anticuerpo control. R3Mab medió en una considerable actividad citolítica de las PBMC contra ambas líneas celulares de mieloma (Figura 14 C, D). Por el contrario, R3Mab no sostuvo la citólisis de las Células RT112 o UMUC-14 de cáncer de vejiga (Figura 14 E, F). Según determinación por el análisis de Scatchard, las células de mieloma múltiple expresan una cantidad sustancialmente mayor de FGFR3 en la superficie celular que las líneas celulares de carcinoma de vejiga (~ 5–6 veces más receptores por célula; Figura 23 A, B).

Para abordar la contribución de la ADCC a la actividad de R3Mab in vivo, introdujimos la mutación antes caracterizada D265A/N297A (DANA) en el dominio Fc del anticuerpo. Esta sustitución doble en el dominio Fc de un anticuerpo anula su unión a FcγRs (39), lo que impide el reclutamiento de células efectoras inmunes. La mutación DANA no alteró la unión de R3Mab a FGFR3 ni la inhibición de la actividad

de FGFR3 in vitro, ni tampoco cambió la farmacocinética del R3Mab en ratones (no se ilustran datos). Sin embargo, abolió sustancialmente la actividad in vivo contra xenoinjertos de OPM2 o KMS11 (Figura 14 G, H). Por el contrario, la mutación DANA no alteró la actividad antitumoral de R3Mab hacia xenoinjertos de cáncer de vejiga RT112 y UMUC-14 (Figura 24 A, B). Juntos, estos resultados sugieren que la ADCC dependiente de Fc desempeña un rol de importancia en la eficacia de R3Mab contra xenoinjertos de mieloma múltiple OPM2 y KMS11.

Otros estudios con xenoinjertos

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

- (a) Se analizó R3Mab para determinar la eficacia in vivo utilizando un modelo de xenoinjerto de tumores basado en una línea celular de cáncer de hígado (Huh7) esencialmente de la manera antes descrita. Cuando se lo analizó en una concentración del anticuerpo de 5 mg/kg y 30 mg/kg, R3Mab inhibió significativamente el desarrollo de tumores in vivo. El crecimiento de los tumores fue inhibido 50% en comparación con el crecimiento de tumores en los animales control.
- (b) Se analizó R3Mab para determinar la eficacia in vivo utilizando un modelo de xenoinjerto de tumores basado en una línea celular de cáncer mamario (Cal-51) que expresaba FGFR3 esencialmente de la manera antes descrita. Los resultados de este estudio de eficacia demostraron que el anticuerpo R3Mab podía inhibir los tumores in vivo cuando se lo analizó en una concentración del anticuerpo en el rango de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg. El crecimiento de los tumores fue inhibido aproximadamente 30% en comparación con el crecimiento de tumores en los animales control.

Comentarios

La asociación de la sobreexpresión de FGFR3 con un mal pronóstico en pacientes con t(4;14)+ mieloma múltiple y la actividad transformante del FGFR3 activado en varios modelos experimentales han instaurado a FGFR3 como propulsor oncogénico importante y, por ende, un potencial objetivo terapéutico en esta malignidad hematológica. Por el contrario, pese a los informes de alta frecuencia de mutación y/o sobreexpresión del FGFR3 en el carcinoma de vejiga (24, 25, 40), no se ha establecido in vivo un rol crítico de la señalización del FGFR3 en esta malignidad epitelial. Por añadidura, no se ha definido aún el potencial terapéutico de la inhibición

del FGFR3 en el cáncer de vejiga. En este estudio demostramos que la intervención genética o farmacológica del FGFR3 inhibe el desarrollo de varios xenoinjertos de cáncer de vejiga humanos en ratones. Estos resultados demuestran que la función del FGFR3 es crítica para el desarrollo de tumores en estas circunstancias., subrayando la importancia potencial de este receptor como propulsor oncogénico y agente terapéutico en el cáncer de vejiga. El bloqueo de la función del FGFR3 inhibió igualmente el crecimiento de xenoinjertos que expresaban el FGFR3 WT o mutante, lo que sugirió que ambas formas del receptor pueden contribuir significativamente al progreso de tumores de vejiga. Aunque con mucha menos frecuencia que en el cáncer de vejiga, se han identificado mutaciones o sobreexpresión de FGFR3 en otras malignidades de tumores sólidos, incluyendo el carcinoma cervical (40), el carcinoma hepatocelular (41) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (42, 43), sugiriendo una potencial contribución del FGFR3 a otros tipos de cáncer epitelial.

La evidente participación del FGFR3 en diversas malignidades identifica a este receptor como candidato interesante para la terapia dirigida. Si bien se han descrito compuestos de pequeñas moléculas que pueden inhibir la actividad de quinasa del FGFR3 (18–22, 44), la estrecha homología de los dominios de quinasa dentro de la familia del FGFR ha obstaculizado el desarrollo de inhibidores selectivos del FGFR3. La falta de selectividad de los inhibidores presentados dificulta la elucidación de la contribución relativa del FGFR3 a la biología de tipos de cáncer específicos; más aun, puede acarrear riesgos de seguridad, poniendo techo a los niveles de dosificación máxima y, de esa manera, limitando la inhibición óptima del FGFR3. Por lo tanto, para obtener el direccionamiento selectivo y específico del FGFR3, recurrimos a una estrategia basada en anticuerpos. Inferimos que un anticuerpo terapéutico óptimo debería poder bloquear no sólo el FGFR3 WT sino también los mutantes prevalentes ligados al cáncer del mismo. Más aun, dado que la dimerización del FGFR3 es esencial para su activación, un anticuerpo que no sólo bloquee la unión al ligando sino también interfiera con la dimerización del receptor podría ser superior. Otras propiedades ventajosas incluirían la capacidad de sostener la función efectora mediada por el Fc y la prolongada vida media en suero conferida por el marco natural de un anticuerpo de longitud total. Enfocamos nuestros esfuerzos de selección e ingeniería en la identificación de una molécula de anticuerpo que combina todas estas características, llevando a la generación del R3Mab. Los estudios de unión demostraron la capacidad de R3Mab para competir con los ligandos de FGF para la interacción con ambas isoformas IIIb y IIIc de FGFR3. Otros experimentos con líneas

celulares transfectadas BaF/3 confirmaron la capacidad notable del R3Mab para bloquear tanto el FGFR3 WT como los mutantes prevalentes del mismo asociados al cáncer. Además, R3Mab ejerció considerable actividad antitumoral en varios modelos de xenoinjerto de cáncer de vejiga que expresaban el FGFR3 WT o FGFR3^{S249C}, que es el mutante más común del receptor en esta enfermedad. Los estudios farmacodinámicos sugirieron que la actividad antitumoral de R3Mab en estos modelos se basa en la inhibición de la señalización del FGFR3, evidente por la fosforilación disminuida de sus mediadores secuencia abajo FRS2 α y MAPK. Estos datos refuerzan además la conclusión de que el FGFR3 es indispensable para el progreso de tumores de vejiga, como lo demuestran nuestros estudios de ARNsh de FGFR3.

Las mutaciones del FGFR3 en el cáncer de vejiga representan una de las alteraciones oncogénicas más frecuentes de una proteína quinasa en malignidades de tumores sólidos, que reconocen la mutación común del B-Raf en melanoma (45). La mayoría de las mutaciones activadoras de FGFR3 da origen a una cisteína no apareada, que lleva a la dimerización independiente de ligandos del receptor y a diversos grados de activación constitutiva. Un estudio anterior que utilizaba un fragmento Fab monovalente anti-FGFR3 indicó actividad inhibitoria diferencial contra mutantes de FGFR3 (46); Sin embargo, no se investigó la base molecular para esta variable molecular. En comparación con los fragmentos de anticuerpos monovalentes, los anticuerpos bivalentes tienen la capacidad de inducir el arracimamiento de antígenos y, en el caso de las tirosina quinasas para el receptor, puede causar la oligomeroización y activación del receptor. Pese a su configuración bivalente de longitud total, el R3Mab inhibición universal de FGFR3 WT y del amplio espectro de mutantes de FGFR3, incluyendo las variantes que son dependientes de ligandos (FGFR3^{G372C}, FGFR3^{Y375C}), constitutivamente activos (FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}), o ambos (FGFR3^{K652E}). Estos resultados suscitan la duda: ¿De qué manera el R3Mab antagoniza tanto el WT como los diversos mutantes de FGFR3, incluyendo los variantes ligados por disulfuro?

Sobre la base de este alineamiento de secuencias con FGFR1, el epítipo peptídico reconocido por R3Mab se superpone con los residuos de FGFR3 implicados en la unión del ligando y heparina, como así también en la dimerización del receptor. Se confirmó esta conclusión por estudios cristaligráficos del complejo entre R3Mab y las regiones extracelulares del FGFR3. La estructura de rayos X reveló que el anticuerpo se une a regiones de la IgD2 e IgD3 que son críticas para la interacción ligando–receptor, como así también para el contacto receptor–receptor. De esa

manera, R3Mab puede bloquear el FGFR3 WT tanto compitiendo por la unión al ligando como previniendo la dimerización receptor. R3Mab puede emplear un mecanismo similar para inhibir el FGFR3^{K652E}, que tiene baja actividad constitutiva, aunque requiere el ligando para la activación completa. Más aun, la unión de R3Mab cambia la orientación relativa de la IgD3 de FGFR3 con respecto a IgD2. Este hallazgo sugiere la posibilidad formal de que el anticuerpo también podría inhibir la activación del receptor forzando una conformación que no conduce a la transducción de señal – una noción que requiere más estudio.

Para obtener una mayor comprensión de la manera en que R3Mab bloquea las variantes de FGFR3 que poseen una cisteína no apareada, analizamos el mutante más común, FGFR3^{S249C}, en forma más detallada. Los experimentos con el bloqueante DTNB libre de sulfhidrilo indicaron un equilibrio dinámico entre el estado monomérico y dimérico de FGFR3^{S249C}. Se ha dado a conocer un equilibrio similar entre los estados oxidado y reducido modulados por reguladores redox endógenos de los receptores NMDA (46). La incubación de células de cáncer de vejiga que expresaban FGFR3^{S249C} con R3Mab llevó a una declinación de la cantidad de dímeros receptores y a un aumento consiguiente del nivel de monómeros. Más aun, el fragmento IgD2–D3 purificado de FGFR3^{S249C} formó dímeros en solución, cuando se lo incubó con R3Mab, los dímeros desaparecieron en forma estable en tanto que el FGFR3^{S249C} monomérico se acumuló. Considerados en conjunto con el análisis estructural, estos resultados sugieren que R3Mab captura el FGFR3^{S249C} monomérico y obstaculiza su dimerización. Con el tiempo, el R3Mab desplaza el equilibrio hacia el estado monomérico, bloqueando la actividad del receptor constitutivo. Este mecanismo también podría explicar la forma en que R3Mab inhibe otros mutantes de cisteína del FGFR3.

Otro hallazgo importante de este estudio fue la potente actividad antitumoral de R3Mab contra las líneas celulares de mieloma múltiple t(4;14)+ OPM2 y KMS11 in vivo. Por el contrario, R3Mab tuvo un impacto modesto a mínimo sobre la proliferación o supervivencia de estas células en cultivo. Las células OPM2 y KMS11 expresan niveles superficiales de FGFR3 relativamente elevados en las células (5–6 veces más altos que las células de carcinoma de vejiga RT112 y UMUC–14). Estas densidades más elevadas del antígeno pueden dar lugar a que R3Mab sostenga el reclutamiento eficiente de las células efectoras inmunes portadoras de FcγR y la activación de la ADCC. En efecto, en presencia de PBMC humanas, R3Mab medió en la citólisis de las células OPM2 y KMS11, pero no en las células de cáncer de vejiga RT112 o UMUC–

14. Más aun, la versión mutante DANA del R3Mab, que no tiene la capacidad de unirse a FcγR, no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de KMS11 ni OPM2 in vivo, aunque aun así suprimió el crecimiento de tumores RT112 y UMUC-14 de manera similar a R3Mab. Sumados, estos datos indican que R3Mab tiene un doble mecanismo de actividad antitumoral: (a) En células que expresan niveles superficiales más bajos de FGFR3 WT o mutante, bloquea la señalización dependiente del ligando o constitutiva; (b) En células que expresan niveles superficiales relativamente más elevados de FGFR3, induce la ADCC.

Nuestros resultados suscitan asimismo nuevos interrogantes. En primer lugar, se desconoce la razón por la cual las líneas celulares de cáncer de vejiga analizadas en este estudio exhiben sensibilidad variable al R3Mab. Dicha respuesta diferencia, que es común en el caso de la terapia dirigida, puede constituir un reflejo de la constitución genética diferenciada de los tumores individuales. En efecto, las células de cáncer mamario Her2-positivas exhiben sensibilidad variable al anticuerpo anti-Her2 (48), al igual que diversas células cancerosas en la respuesta al anticuerpo anti-EGFR (49). En este contexto, se necesita con urgencia desarrollar más modelos in vivo de cáncer de vejiga con FGFR3 WT y mutante para evaluar la sensibilidad a las moléculas de FGFR3 en animales. Más aun, la elucidación de biomarcadores predictivos puede contribuir a identificar a los pacientes que pueden obtener un beneficio óptimo de la terapia dirigida al FGFR3. En segundo lugar, como R3Mab no indujo regresión de los tumores en los modelos que examinamos, los futuros estudios deberían explorar si R3Mab puede cooperar con los agentes terapéuticos ya reconocidos.

En conclusión, nuestros hallazgos implican tanto FGFR3 WT como mutante como importantes para el desarrollo del cáncer de vejiga, expandiendo así la participación oncogénica in vivo de este receptor de malignidad hematológica a epitelial. Más aun, nuestros resultados demuestran que tanto el FGFR3 WT como mutante pueden ser tomados como blanco con eficacia en tumores con un anticuerpo de longitud total que combina la capacidad para bloquear la unión a ligandos, la dimerización y señalización del receptor, como así también para promover la lisis de las células tumorales por ADCC. Estos resultados ofrecen un fuerte base racional para la investigación de terapias dirigidas al FGFR3 basadas en anticuerpos en diversas malignidades asociadas a este receptor.

Lista Parcial de Referencias

1. Eswarakumar, V.P., Lax, I. y Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139–149.
2. L'Hote, C.G. y Knowles, M.A. 2005. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 304:417–431.
3. Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A. y Basilico, C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:233–247.
4. Mohammadi, M., Olsen, S.K. y Ibrahimi, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107–137.
5. Grose, R. y Dickson, C. 2005. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179–186.
6. Chang, H., Stewart, A.K., Qi, X.Y., Li, Z.H., Yi, Q.L. y Trudel, S. 2005. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in mieloma múltiple. *Blood* 106:353–355.
7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M. y Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in mieloma múltiple es associated with increased expression and activating mutaciones of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260–264.
8. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., et al. 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101:4569–4575.
9. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., Bataille, R. y Avet-Loiseau, H. 2002. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of mieloma múltiple, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100:1579–1583.
10. Pollett, J.B., Trudel, S., Stern, D., Li, Z.H. y Stewart, A.K. 2002. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexametasona resistance. *Blood* 100:3819–3821.
11. Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Larde, C., Caillaud, A., Diez de Medina, S.G., Cappellen, D., Graff, G., Thiery, J.P., Chopin, D., Ricol, D., et al. 2006.

Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 27:740–747.

12. Agazie, Y.M., Movilla, N., Ischenko, I. y Hayman, M.J. 2003. The fosfotirosina fosfatase SHP2 es a critical mediator of transformación induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 22:6909–6918.

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

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

15. Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G. y Stewart, A.K. 2000. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferaci3n and prevents apoptosis. *Blood* 95:992–998.

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

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

18. Trudel, S., Ely, S., Farooqi, Y., Affer, M., Robbiani, D.F., Chesi, M. y Bergsagel, P.L. 2004. Inhibici3n of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 103:3521–3528.

19. Trudel, S., Li, Z.H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C. y Stewart, A.K. 2005. CHIR–258, a novel, multitargeted inhibidor de la tirosina quinasa for the potential tratamiento of t(4;14) mieloma múltiple. *Blood* 105:2941–2948.

20. Chen, J., Lee, B.H., Williams, I.R., Kutok, J.L., Mitsiades, C.S., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., Coburn, A., et al. 2005. FGFR3 as a

therapeutic target of the small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 24:8259–8267.

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

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

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

24. Tomlinson, D.C., Baldo, O., Harnden, P. y Knowles, M.A. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutación status and prognostic variables in cáncer de vejiga. *J Pathol* 213:91–98.

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

26. Tomlinson, D.C., Hurst, C.D. y Knowles, M.A. 2007. Knockdown by ARNsh identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in cáncer de vejiga. *Oncogene* 26:5889–5899.

27. Martinez–Torrecuadrada, J., Cifuentes, G., Lopez–Serra, P., Saenz, P., Martinez, A. y Casal, J.I. 2005. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single–chain Fv anticuerpos inhibe bladder carcinoma línea celular proliferación. *Clin Cancer Res* 11:6280–6290.

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

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

30. d'Avis, P.Y., Robertson, S.C., Meyer, A.N., Bardwell, W.M., Webster, M.K. y Donoghue, D.J. 1998. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutaciones responsible for the lethal skeletal displasia thanatophoric displasia type I. *Cell Growth Differ* 9:71–78.
31. Adar, R., Monsonego–Ornan, E., David, P. y Yayon, A. 2002. Differential activation of cisteína–sustitución mutants of fibroblast growth factor receptor 3 es determined by cisteína localization. *J Bone Miner Res* 17:860–868.
32. Knowles, M.A. 2008. Novel therapeutic targets in cáncer de vejiga: mutación and expression of FGF receptors. *Future Oncol* 4:71–83.
33. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J. y Ornitz, D.M. 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutaciones causing achondroplasia and thanatophoric displasia. *Nat Genet* 13:233–237.
34. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. y Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerización and activation. *Cell* 98:641–650.
35. Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., Raucci, A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Yayon, A., Basilico, C., Linhardt, R.J., Schlessinger, J. y Mohammadi, M. 2004. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibición and ligando–binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:935–940.
36. Jebar, A.H., Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F. y Knowles, M.A. 2005. FGFR3 and Ras gene mutaciones are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218–5225.
37. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhidryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77.
38. Adams, G.P. y Weiner, L.M. 2005. Monoclonal anticuerpo therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147–1157.
39. Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W.P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W.Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., et al. 2005. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174:817–826.
40. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre–Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P. y Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutaciones of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18–20.

41. Qiu, W.H., Zhou, B.S., Chu, P.G., Chen, W.G., Chung, C., Shih, J., Hwu, P., Yeh, C., Lopez, R. y Yen, Y. 2005. Over-expression of fibroblast growth factor receptor 3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11:5266–5272.
42. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K. y Eckhardt, F. 2008. Correlative gene expression and DNA metilation profiling in lung development nominate new biomarkers in cáncer de pulmón. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1494–1508.
43. Woenckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P., Bettstetter, M., Wuensch, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., et al. 2006. Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell cáncer de pulmóns. *J Pathol* 210:192–204.
44. Xin, X., Abrams, T.J., Hollenbach, P.W., Rendahl, K.G., Tang, Y., Oei, Y.A., Embry, M.G., Swinarski, D.E., Garrett, E.N., Pryer, N.K., et al. 2006. CHIR-258 es efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic mieloma múltiple model in mice. *Clin Cancer Res* 12:4908–4915.
45. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. 2002. Mutaciones of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954.
46. Trudel, S., Stewart, A.K., Rom, E., Wei, E., Li, Z.H., Kotzer, S., Chumakov, I., Singer, Y., Chang, H., Liang, S.B., et al. 2006. The inhibitory anti-FGFR3 anticuerpo, PRO-001, es citotóxico to t(4;14) células de mieloma múltiple. *Blood* 107:4039–4046.
47. Gozlan, H. y Ben-Ari, Y. 1995. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol Sci* 16:368–374.
48. Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M. y Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal anticuerpo has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165–1172.
49. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J.D., Wolf, B., Sato, G. y Mendelsohn, J. 1984. Growth inhibición of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor anticuerpos monoclonales. *Cancer Res* 44:1002–1007.
50. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., and French, D.M. 2008. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res* 68:5086-5095.

51. Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F., and Slamon, D. 1999. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18:2241-2251.
52. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. 2004. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-1093.
53. Liang, W.C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., et al. 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366:815-829.
54. Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
55. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338:299-310.
56. Otwinowski, Z.a.M., W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276:307-326.
57. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:458-464.
58. Emsley, P., and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132.
59. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255.

Si bien la invención que antecede ha sido descripta con cierto detalle a manera de ilustración y ejemplo para aportar claridad de comprensión, las

descripciones y ejemplos no deben ser considerados limitantes del alcance de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH INC.

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

<130> P4294R1

<140>

<141>

<150> 61/163,222

<151> 2009-03-25

<160> 271

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 1

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

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 2

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

Lys Gly

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 3

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

Val Met Asp Tyr
20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 4

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

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

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

<400> 5
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

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

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

<400> 6
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

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

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

<400> 7
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

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

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

<400> 8
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

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

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

<400> 9
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

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

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

<400> 10
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
1 5 10

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

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

<400> 11
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

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

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

<400> 12
Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
1 5

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

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

<400> 13
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

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

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

<400> 14
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

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

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

<400> 15
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

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

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

<400> 16
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser Leu Ala
 1 5 10

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

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

<400> 17
 Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

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

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

<400> 18
 Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
 1 5

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

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

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

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

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

<400> 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

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

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

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

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

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

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

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

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

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

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

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 25

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

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

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

<400> 33
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

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

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

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 35
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 39
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 40
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido

sintético"

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 43

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

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 45

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

<210> 46

<211> 25

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 46
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 47
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 48
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 49
Gly Arg Ile Tyr Pro Leu Tyr Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 50
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 50
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 51
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 52
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 53
 Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Thr
 1 5

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

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

<400> 54
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

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

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

<400> 55
 Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Asp Ser Phe Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

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

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

<400> 56
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 57
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 58
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 59
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 60
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 61
<211> 18

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 61
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 62
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 63
Arg Ala Ser Gln Val Ile Asp Ile Ser Leu Ala
1 5 10

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

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

<400> 64
Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 65
Gln Gln Ser Ala Ala Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 66

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

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

<400> 66
 Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 67
 Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 68
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 69
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 70
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 71

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 72

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

<210> 73
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 73

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

Lys Gly

<210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 74

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

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 76
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 77
 Gln Gln Thr Tyr Ser Ala Gln Pro Thr
 1 5

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 78
 Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 79
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 79
 Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Ser Ala Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 80
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 80
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 81
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 82
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 83
Gln Gln Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr
1 5

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 84
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 85
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 85
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 86
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 87
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 88
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 89
 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 90
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 91
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 91
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 92
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 92
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 93
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 94
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 95
 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 96
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 97
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 97
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 98
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 98
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 99
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 100
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 101
 Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 102
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 103
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 103
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 104
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 104
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 105

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

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 106
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 107
Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
1 5

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 108
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 109
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 109
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 110
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 110
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 111
Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 112
Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 113
Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 114
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 115
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 115
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 116
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 116
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 117
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 117
 Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 118
 Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 119
 Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 120
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 121
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 121
 Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 122
 Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 123
 Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 124
 Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 125
 Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 126

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

<210> 127
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 127

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

Lys Gly

<210> 128
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 128

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

Val Met Asp Tyr
 20

<210> 129
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 129

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

<210> 130
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 130

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 131
Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 132
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 132
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 133
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 133
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 134
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 134
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
 100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

<210> 135
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 135
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 136

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 136

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Leu Tyr Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 137

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 138

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 138

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

<210> 139

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 139

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Glu Thr Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 140

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

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 141

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 142

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr
 1 5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 143

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

<210> 144
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 144
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 145
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 145
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Asp"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ile"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Glu" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Ile"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(10)

<223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 146
Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo consignado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la notación correspondiente a dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(6)
<223> /nota="El residuo consignado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la notación correspondiente a dicha posición"

<400> 147
Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Ser" o "Thr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Ser" o "Thr" o "Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="His" o "Asp" o "Thr" o "Asn"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Pro" o "Ser"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Leu" o "Pro" o "Gln"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(8)
 <223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 148
 Gln Gln Gly Thr Gly Ala Gln Ser Thr
 1 5

<210> 149
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Thr"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> /nota="El residuo consignado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la notación correspondiente a dicha posición"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Ser" o "Thr"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Gly" o "Thr"

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (5)..(6)
 <223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 149
 Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 150
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Ala" o "Leu" o "Ser" o "Thr"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar="Gln" o "Asp" o "Gly" o "Tyr" o

"Ser" o "Asn" o "Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Asp" o "Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Phe" o "Thr" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="His" o "Asn" o "Ile"

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(11)
<223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 150
Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Ala Ala Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 151
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 151
Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
1 5 10 15

Val Met Asp Tyr
20

<210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Asp"

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> /nota="El residuo consignado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a la notación correspondiente a dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Glu" o "Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Ile"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> característica_misc

<222> (7)..(9)

<223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 152

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

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Gly" o "Thr"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Thr" o "Ala"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar="Gly"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar="His" o "Asn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Gln" o "Tyr" o "Leu"

<220>

<221> característica_misc

<222> (3)..(8)

<223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas posiciones"

<400> 153

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 154

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

```

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

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Ser" o "Gly" o "Ala" o "Gln"

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(7)
<223> /nota="Los residuos consignados en la secuencia no tienen preferencia
        con respecto a los indicados en las notaciones correspondientes a dichas
        posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="His"

<220>
<221> característica_misc
<222> (11)..(11)
<223> /nota="El residuo consignado en la secuencia no tiene preferencia
        con respecto a la notación correspondiente a dicha posición"

<400> 154
Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
1      5      10      15

Lys Gly

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 155
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1      5      10

<210> 156
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 156
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1      5      10

<210> 157
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 157
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1      5      10

<210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 158
Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Ile Leu Ala Ser
1      5      10

```

<210> 159
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 159
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 160
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 160
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5 10

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 161
Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 162
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 163
Gln Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 164
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Tyr
1 5 10

<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 165
Gly Tyr Val Phe Thr His Tyr Asn Met Tyr
1 5 10

<210> 166
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 166
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5 10

<210> 167

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 167
 Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
 20

<210> 168
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 168
 Trp Ile Gly Tyr Ile Glu Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
 20

<210> 169
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 169
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
 20

<210> 170
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 170
 Ala Ser Pro Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 171
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 171
 Ala Arg Gly Gln Gly Pro Asp Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 172
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 172
 Ala Arg Trp Gly Asp Tyr Asp Val Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 173
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 173
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 174
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 174
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 175
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 175
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 176
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 176
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 177
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 177
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 178
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 178
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 179
 Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 180
 Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
 1 5 10 15

<210> 181
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser
1 5 10 15

<210> 182

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro
1 5 10 15

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 183

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 184

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 184

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 185

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 185

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

<210> 186

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

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

<400> 186

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 187
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 187
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 188
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 188
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 189
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 189
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 190
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 190
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 191

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

```
<210> 192
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
artificial"
```

```
<400> 192
gatccccgca tcaagctgcg gcatcattca agagatgatg ccgcagcttg atgctttttt    60
ggaaa                                           65
```

```
<210> 193
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
Artificial"
```

```
<400> 193
gatccccctgc acaacctcga ctactattca agagatagta gtcgagggttg tgcatttttt    60
ggaaa                                              65
```

```
<210> 194
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
artificial"
```

```
<400> 194
gatccccaac ctcgactact acaagattca agagatcttg tagtagtcga ggtttttttt 60
ggaaa 65
```

```
<210> 195
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
```

```
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador
artificial"
```

<400> 195
gtcagatatc gtkctsa~~mc~~ artctccwgc 30

```
<210> 196
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
```

```
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador
artificial"
```

<400> 196
gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg 37

<210>	197
<211>	27

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 197
 gtcagatatc gtgctgacmc artctcc 27

 <210> 198
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 198
 gatcgacgta cgctgagatc carytgcrc artctgg 37

 <210> 199
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 199
 gtacgatatc cagatgacmc artctcc 27

 <210> 200
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 200
 gatcgacgta cgctgagatc carytgcrc artctgg 37

 <210> 201
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 201
 tttdakytcc agcttggtac c 21

 <210> 202
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Cebador artificial"

 <400> 202
 acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

<210> 203
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 203
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 204
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 204
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 205
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 205
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 206
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 206
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 207
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 207
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

	20	25	30
<210>	208		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	Secuencia artificial		
<220>			
<221>	origen		
<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"		
<400>	208		
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	1 5 10		
<210>	209		
<211>	13		
<212>	PRT		
<213>	Secuencia artificial		
<220>			
<221>	origen		
<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"		
<400>	209		
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	1 5 10		
<210>	210		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	Secuencia artificial		
<220>			
<221>	origen		
<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"		
<400>	210		
	Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu		
	1 5 10 15		
	Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	20 25 30		
<210>	211		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	Secuencia artificial		
<220>			
<221>	origen		
<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"		
<400>	211		
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	1 5 10		
<210>	212		
<211>	13		
<212>	PRT		
<213>	Secuencia artificial		
<220>			
<221>	origen		
<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"		
<400>	212		
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	1 5 10		

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

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

<400> 213
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 214
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 214
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 215
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 215
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 216
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 216
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 217
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 217
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 218
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 218
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10

<210> 219
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 219
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 220
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 220
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 221
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 221
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10

<210> 222
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 222
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 223
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 223
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 224
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 224
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10

<210> 225
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 225
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 226
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 226
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 227
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 227
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 228
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 228
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 229
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 229
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 230
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 230
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 231
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 231
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 232
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 232
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 233
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 233
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 234
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 234
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 235
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 235
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 236
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 236
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 237
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 237
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 238
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 238
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 239
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 239
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 240
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 240
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 20 25 30

<210> 241
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 241
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 242
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 242
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 243
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 243

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 20 25 30

<210> 244
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 244

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 245
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 245

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

<210> 246
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 246

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 20 25 30

<210> 247
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 247

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 248
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 249
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 249
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 250
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 250
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 251
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 251
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 252
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 252
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

```
<210> 253
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 253
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

```
<210> 254
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 254
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

```
<210> 255
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 255
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

```
<210> 256
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 256
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

```
<210> 257
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

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

<400> 257
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 258
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 258
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 259
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 259
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 260
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 260
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 261
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 261
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 262
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 263
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 263
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 264
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 264
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 265
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 265
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 266
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 266
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 267
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 267
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 268
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 268
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 269
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 269
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 270
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 270
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 271
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 271
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista anti-FGFR3 aislado, donde el anticuerpo se une al FGFR3 humano con una K_d de 1×10^{-8} o más, donde el anticuerpo inhibe la dimerización del receptor FGFR3 con otra unidad del receptor, por lo cual se inhibe la activación del receptor y donde el anticuerpo posee actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos.
2. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene la capacidad de destruir una célula de mieloma múltiple que comprende una traslocación t(4;14).
3. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo no induce sustancial regulación a menos del FGFR3.
4. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde una forma bivalente del anticuerpo no posee función agonista sustancial.
5. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se une a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad o similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos LAVPAANTVRFRCPA (SEC ID NO: 179) y/o SDVEFHCKVYSDAQP (SEC ID NO: 180).
6. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se une a por lo menos uno, dos, tres, cuatro, o cualquier número y hasta la totalidad de los residuos 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 y/o 318 de FGFR3 IIIb.

7. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo inhibe la actividad constitutiva de FGFR3.
8. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 7, donde la actividad constitutiva de FGFR3 es una actividad de FGFR3 dependiente del ligando.
9. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 7, donde la actividad constitutiva de FGFR3 es una actividad de FGFR3 independiente del ligando.
10. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo anti-FGFR3 inhibe (a) FGFR3-IIIb^{R248C} y (b) uno o más de FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C} y FGFR3-IIIb^{G372C}.
11. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo comprende:
 - (i) HVR-L3 que comprende la secuencia QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T, en la cual X₁ es G, S o T, X₂ es T, Y o A, X₃ es G, S, T, o A, X₄ es A, H, D, T, o N, X₅ es Q, P o S, X₆ es S, Y, L, P o Q (SEC ID NO: 148),
 - (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia GRIYPX₁X₂X₃X₄X₅X₆YADSVKKG, en la cual X₁ es Y, A, L, S, o T, X₂ es A, Q, D, G, Y, S, N o F, X₃ es A, D, o G, X₄ es T o S, X₅ es K, F, T, o S, X₆ es Y, H, N o I (SEC ID NO: 150), y
 - (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEC ID NO: 151).
12. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo comprende:
 - (i) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A, en la cual X₁ es V o D, X₂ es V o I, X₃ es D, E o S, X₄ es T o I, X₅ es A o S y X₆ es V o L (SEC ID NO: 146),

- (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia X_1ASFLX_2S en la cual X_1 es S o G and X_2 es A o Y (SEC ID NO: 147), and
 - (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia $QQX_1X_2X_3X_4X_5X_6T$, en la cual X_1 es G, S o T, X_2 es T, Y o A, X_3 es G, S, T, o A, X_4 es A, H, D, T, o N, X_5 es Q, P o S, X_6 es S, Y, L, P o Q (SEC ID NO: 148).
13. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 1 o 12, donde el anticuerpo comprende:
- (i) HVR-H1 que comprende la secuencia $GFX_1FX_2X_3TGIS$, en la cual X_1 es S o T, X_2 es W, Y, S o T, X_3 es S, G, o T (SEC ID NO: 149),
 - (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia $GRIYPX_1X_2X_3X_4X_5X_6YADSVKG$, en la cual X_1 es Y, A, L, S, o T, X_2 es A, Q, D, G, Y, S, N o F, X_3 es A, D, o G, X_4 es T o S, X_5 es K, F, T, o S, X_6 es Y, H, N o I (SEC ID NO: 150), y
 - (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia $ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY$ (SEC ID NO: 151).
14. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 12, en el cual HVR-L1 comprende la secuencia $RASQX_1VX_2X_3X_4VA$, en la cual X_1 es V o D, X_2 es D o S, X_3 es T o I, X_4 es A o S (SEC ID NO: 152).
15. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 12, en el cual HVR-L3 comprende la secuencia $QQX_1X_2X_3X_4X_5X_6T$, en la cual X_1 es S, G, o T, X_2 es Y, T, o A, X_3 es T o G, X_4 es T, H o N, X_5 es P o S, X_6 es P, Q, Y, o L (SEC ID NO: 153).
16. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual HVR-H2 comprende la secuencia $GRIYPX_1X_2GSTX_3YADSVKG$, en la cual X_1 es T o L, X_2 es N, Y, S, G, A, o Q; X_3 es N o H (SEC ID NO: 154).
17. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID NO: 132 y una región variable de cadena liviana que comprende SEC ID NO: 133.

18. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual por lo menos una porción de la secuencia marco es una secuencia marco de consenso humana.
19. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 18, en el cual el anticuerpo comprende κ .
20. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con la reivindicación 18, donde el anticuerpo comprende una secuencia marco de consenso humana de cadena pesada del subgrupo III.
21. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
22. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo con afinidad madurada, un anticuerpo humano, un anticuerpo biespecífico y un fragmento de anticuerpo.
23. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
24. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 23.
25. El vector de acuerdo con la reivindicación 24, donde el vector es un vector de expresión.
26. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 24 ó 25.
27. La célula huésped de acuerdo de la reivindicación 26, donde la célula huésped es procariota.

28. La célula huésped de acuerdo de la reivindicación 26, donde la célula huésped es eucariota.
29. La célula huésped de acuerdo de la reivindicación 26, donde la célula huésped es de mamífero.
30. Un método para la preparación de un anticuerpo anti-FGFR3, método que comprende cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para que la expresión del polinucleótido y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, donde la célula huésped es procariota.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 30, donde la célula huésped es eucariota.
33. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
34. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para usar como medicamento.
35. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para usar en el tratamiento del cáncer.
36. El anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 para usar en la inhibición de la proliferación celular o para reducir hasta el agotamiento las células de mieloma múltiple.
37. El uso del anticuerpo antagonista anti-FGFR3 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22 en la elaboración de un medicamento.

38. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer.
39. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde el medicamento es para inhibir la proliferación celular o la reducción hasta el agotamiento de células de mieloma múltiple.

RESUMEN

La invención presenta anticuerpos de FGFR3 y composiciones que los comprenden y métodos para usar estos anticuerpos.

Clon #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
184.6	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.62	G	F	T	F	S	T	T	G	I	S
184.6.21	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.49	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.51	G	F	S	F	T	G	T	G	I	S
184.6.52	G	F	T	F	Y	T	T	G	I	S
184.6.92	G	F	S	F	W	S	T	G	I	S
184.6.1.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.NS	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
D30E										

Clon #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
184.6	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.62	G	R	I	Y	P	L	Y	G	S	T	H	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.21	G	R	I	Y	P	Y	D	D	S	F	Y	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.49	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.51	G	S	I	Y	P	Y	F	A	T	K	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.52	G	R	I	Y	P	A	F	G	S	S	I	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.92	G	R	I	Y	P	S	S	A	T	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.NS	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
D30E																		

FIG. 1A

Clon #	H3																						
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D								M	101	102	
184.6	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.58	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.62	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.21	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.49	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.51	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.52	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.92	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.58.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.58.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.58.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.58.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			
184.6.1.NS D30E	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y			

Clon #	L1											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
184.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.1	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.58	R	A	S	Q	D	V	D	I	S	L	A	
184.6.62	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.21	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.49	R	A	S	Q	V	I	D	I	S	L	A	
184.6.51	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.92	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.1.N54S	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54G	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54A	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54Q	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54S	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54G	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54A	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54Q	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.NS D30E	R	A	S	Q	D	V	E	T	S	L	A	

FIG. 1B

Clon #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
184.6	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58	S	A	S	S	L	A	S
184.6.62	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.21	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.49	G	A	S	T	L	A	S
184.6.51	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.52	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.92	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54S	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54G	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54A	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54Q	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58.N54S	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54G	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54A	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54Q	S	A	S	S	L	A	S
184.6.1.NS	S	A	S	F	L	Y	S
D30E							

Clon #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
184.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.1	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.62	Q	Q	T	Y	T	T	S	L	T
184.6.21	Q	Q	S	Y	T	T	P	L	T
184.6.49	Q	Q	S	A	A	D	P	Y	T
184.6.51	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.52	Q	Q	T	Y	S	A	Q	P	T
184.6.92	Q	Q	S	Y	S	H	Q	S	T
184.6.1.N54S	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54G	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54A	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54Q	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58.N54S	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54G	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54A	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54Q	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.1.NS	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
D30E									

FIG. 1C

Clon 184.6.1.N54S

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEC ID NO: 132)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEC ID NO:133)

Clone 184.6.58

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPTNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEC ID NO:134)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOGAGNPYTFGQGTKVEIKR (SEC ID NO:135)

Clon 184.6.62

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
ARIYPLYGSTHYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEC ID NO:136)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTTSITFGQGTKVEIKR (SEC ID NO:137)

Clon 184.6.1.NS D30E

VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEC ID NO:138)

VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVETSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEC ID NO:139)

FIG. 2A

Clon 1G6

HVR-H1: GYSFTDYNMY (SEC ID NO:164)
 HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO:167)
 HVR-H3: ASPNYDSSPFAY (SEC ID NO:170)
 HVR-L1: SASSSVSYMH (SEC ID NO:155)
 HVR-L2: TWIYDTSILAS (SEC ID NO:158)
 HVR-L3: QQWTSNPLT (SEC ID NO:161)

Clone 6G1

HVR-H1: GYVFTHYNMY (SEC ID NO:165)
 HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO:168)
 HVR-H3: ARGQGPFDV (SEC ID NO:171)
 HVR-L1: SASSSVSYMH (SEC ID NO:156)
 HVR-L2: RWIYDTSKLAS (SEC ID NO:159)
 HVR-L3: QQWSSYPPT (SEC ID NO:162)

Clone 15B2

HVR-H1: GYAFTSYNMY (SEC ID NO:166)
 HVR-H2: WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEC ID NO:169)
 HVR-H3: ARWGDYDVGAMDY (SEC ID NO:172)
 HVR-L1: LASQTIGTWLA (SEC ID NO:157)
 HVR-L2: LLIYAATSLAD (SEC ID NO:160)
 HVR-L3: QQLYSPPWT (SEC ID NO:163)

FIG. 2B

I					
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGGGLEWMG	-H2-	
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWM	-H2-	
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWM	-H2-	
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWM	-H2-	
II					
A	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	
B	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
C	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
D	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	
III					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Aceptora					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
Segunda aceptora					
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	

FIG. 3A

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 19, 203-205
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 20, 206-208
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 21, 209-211
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 22, 212-214
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 23, 215-217
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 24, 218-220
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 25, 221-223
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 26, 224-226
III			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 27, 227-229
B	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 28, 230-232
C	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 29, 233-235
D	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 30, 236-238
Aceptora			
A	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 31, 239-241
B	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 32, 242-244
C	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 33, 245-247
Segunda Aceptora			
A	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 34, 248-250
B	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 35, 251-253
C	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 36, 254-256
D	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTTLVTSS SEC ID NO.: 37, 257-259

FIG. 3B

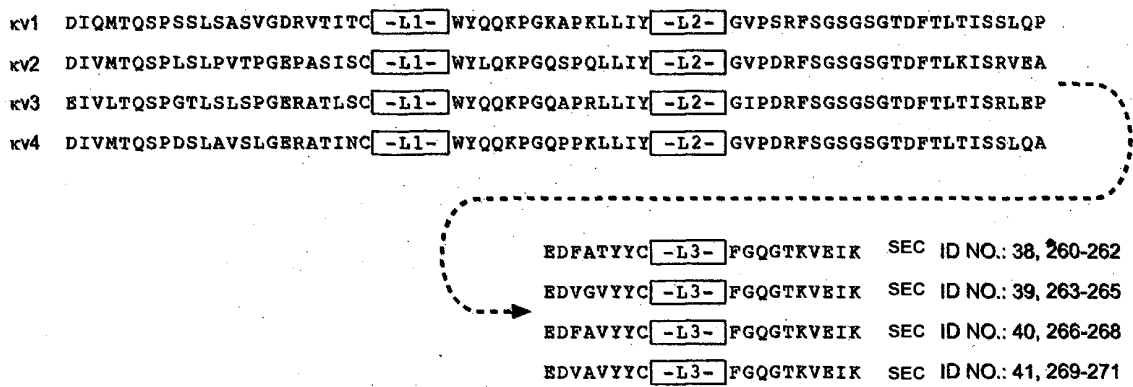


FIG. 4

9 / 35

Secuencias Marco de la cadena liviana de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEC ID NO: 45)

Secuencias Marco de cadena pesada huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEC ID NO: 175)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID NO: 176)

FIG. 5Secuencia Marco de huMAb4D5-8 de c. liviana Modificada en la posición 86 (subrayada)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID NO: 177)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEC ID NO: 45)

Secuencias Marco de huMAb4D5-8 de c. pesada modificada en posiciones 71, 73 y 8 (subrayadas)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEC ID NO: 178)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID NO: 176)

FIG. 6

FIG. 7A

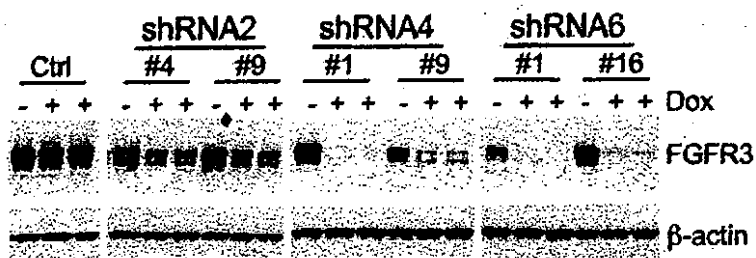


FIG. 7B

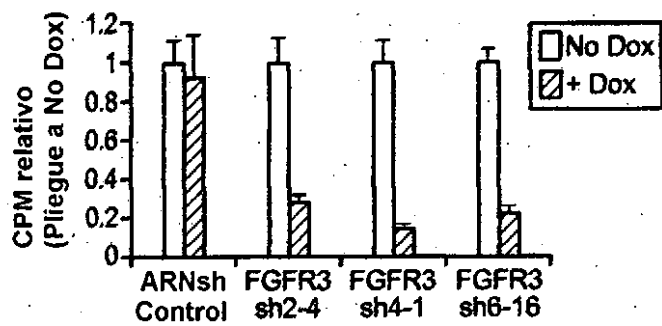
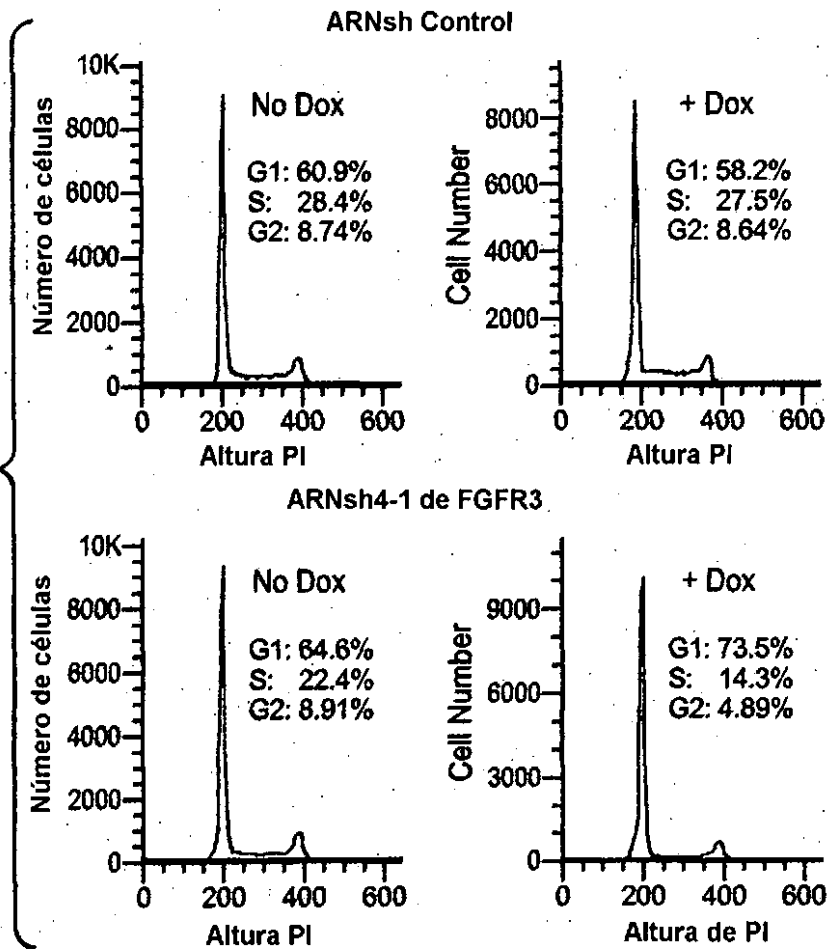


FIG. 7C



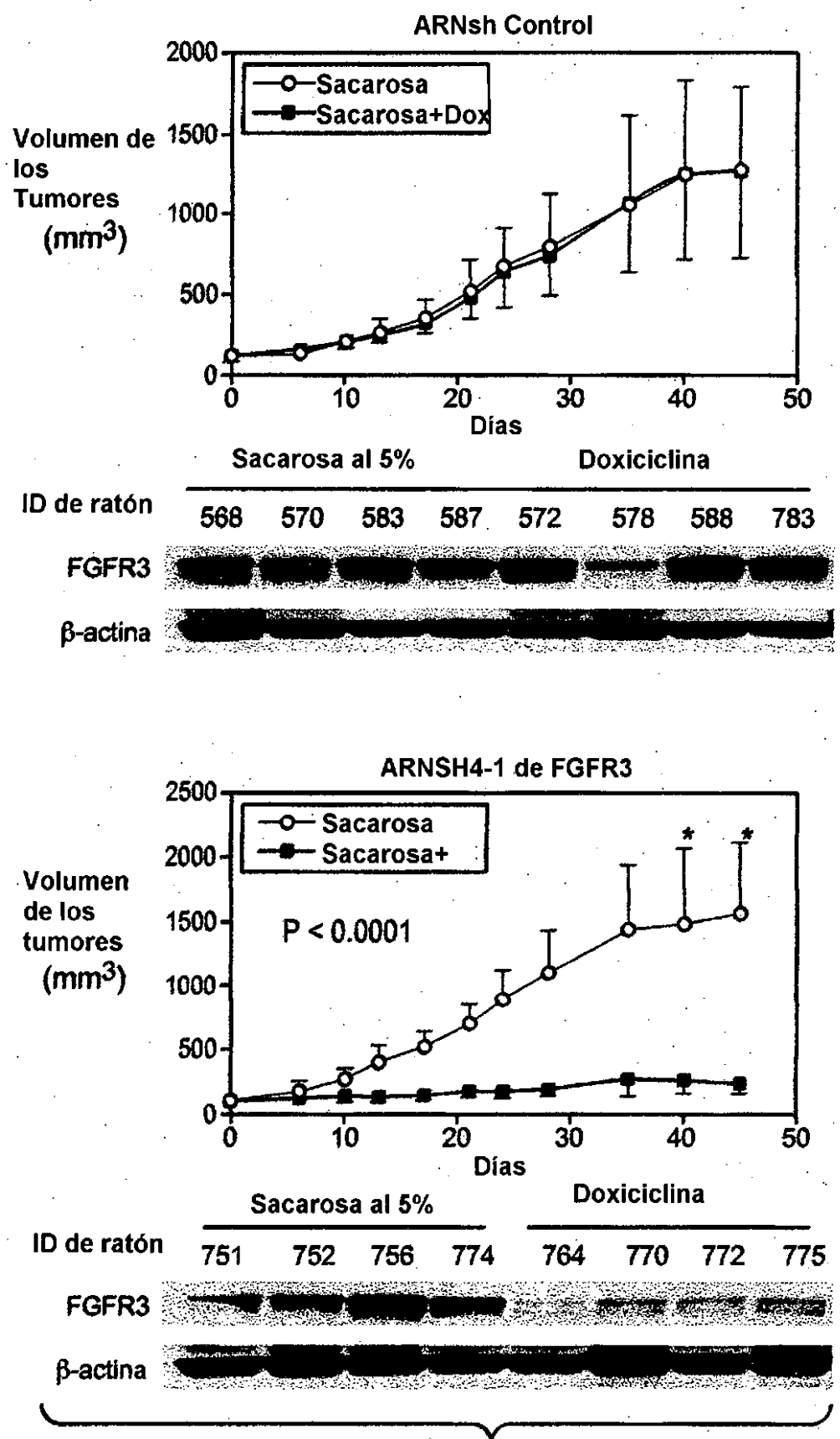
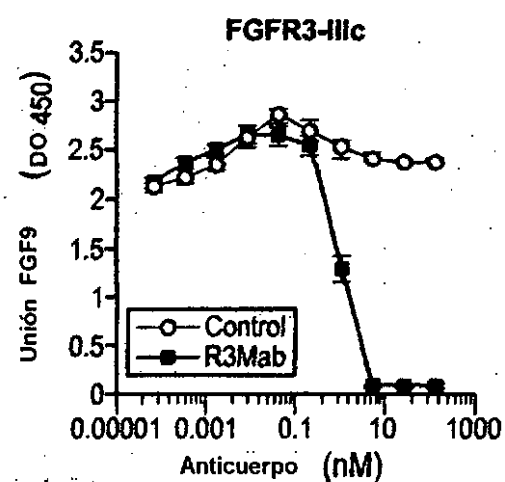
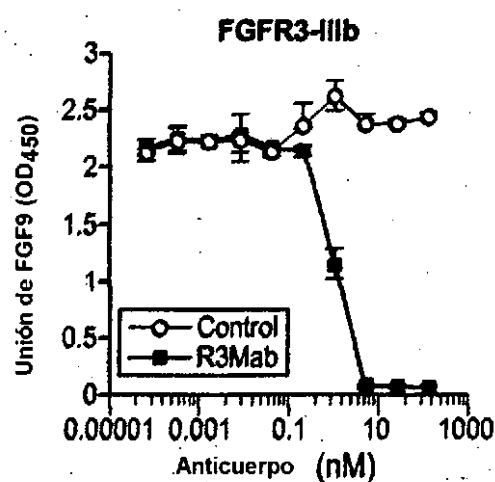
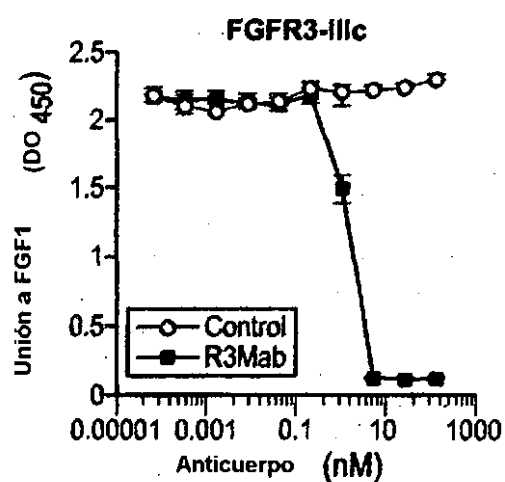
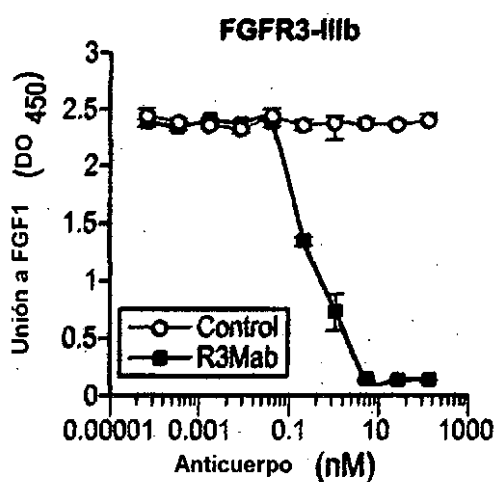
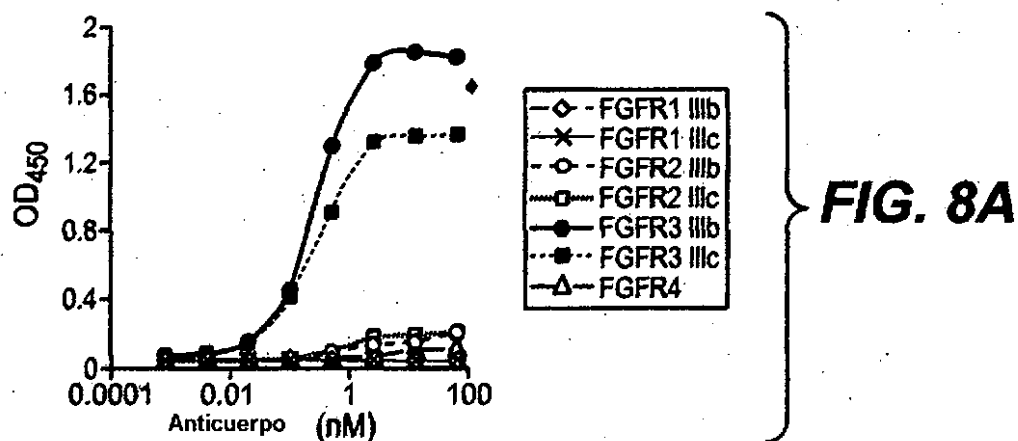


FIG. 7D



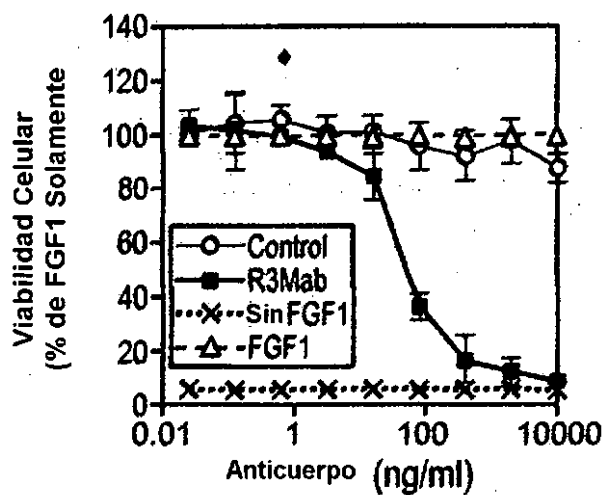


FIG. 9A

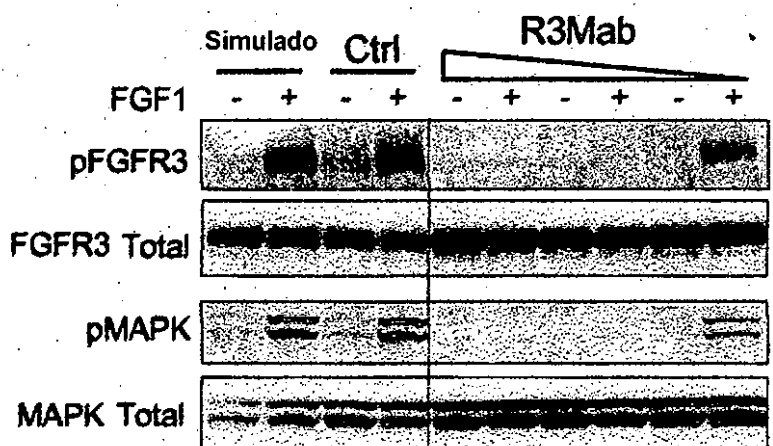


FIG. 9B

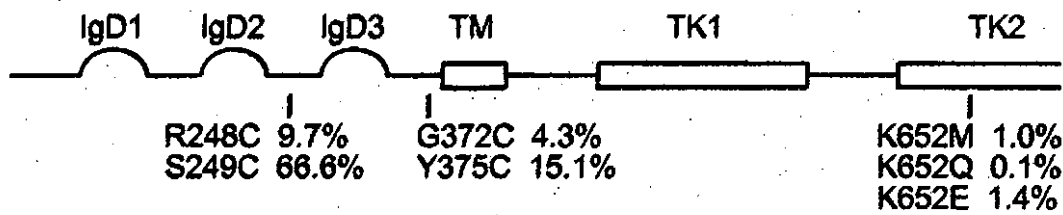


FIG. 9C

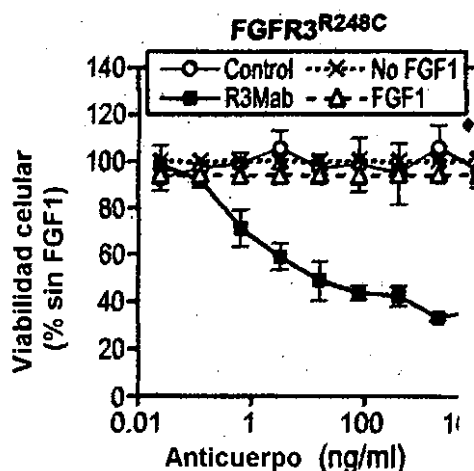


FIG. 9D

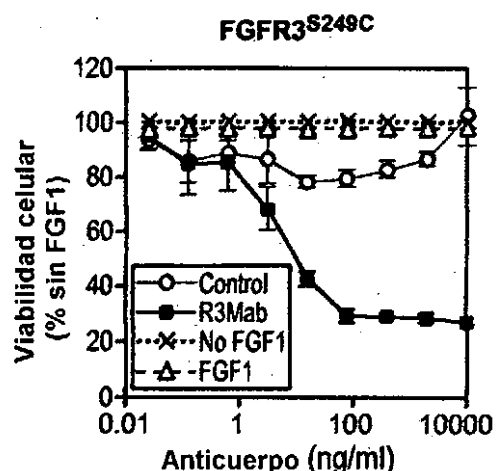


FIG. 9E

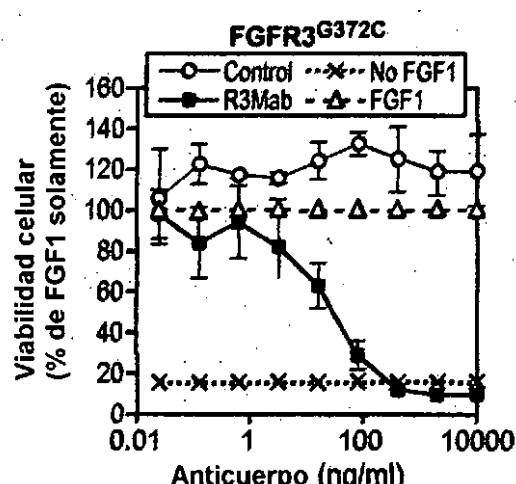


FIG. 9F

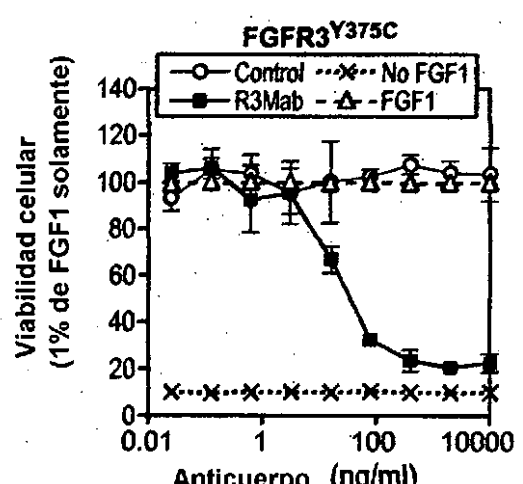


FIG. 9G

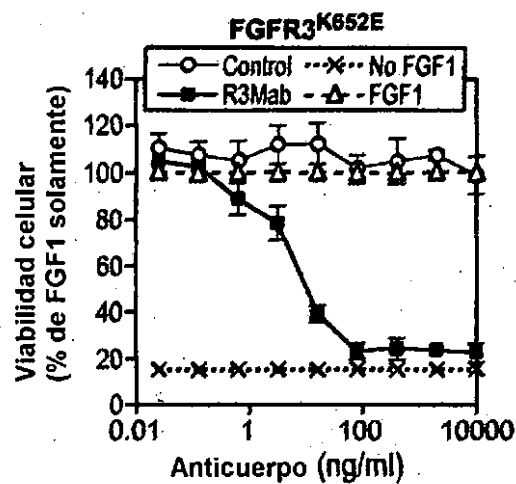


FIG. 9H

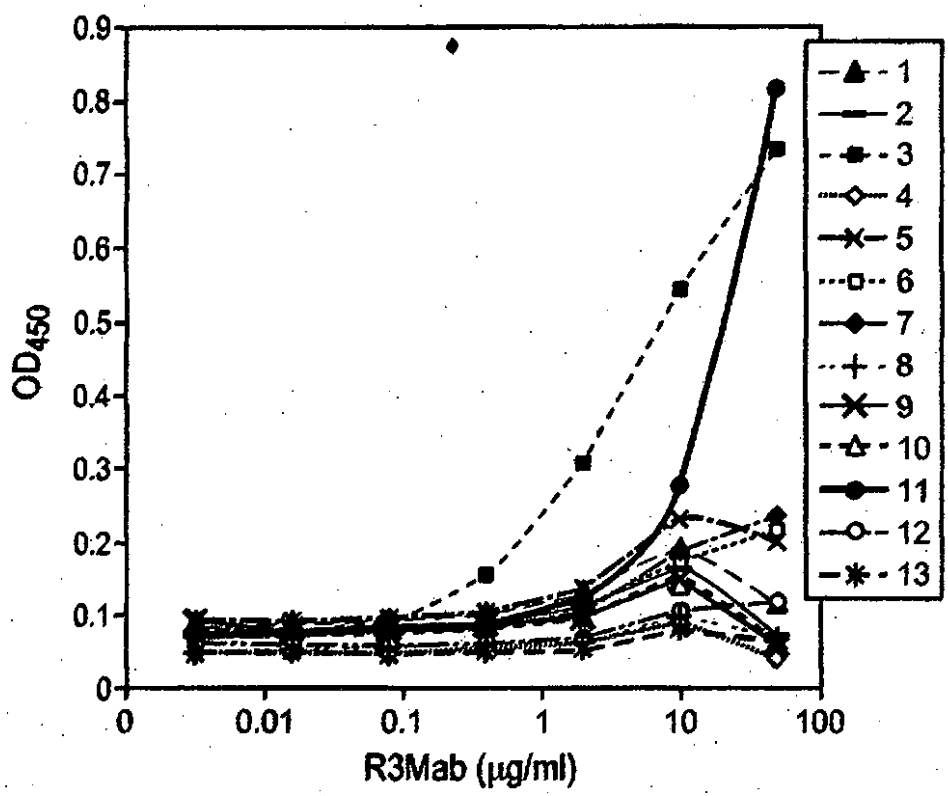
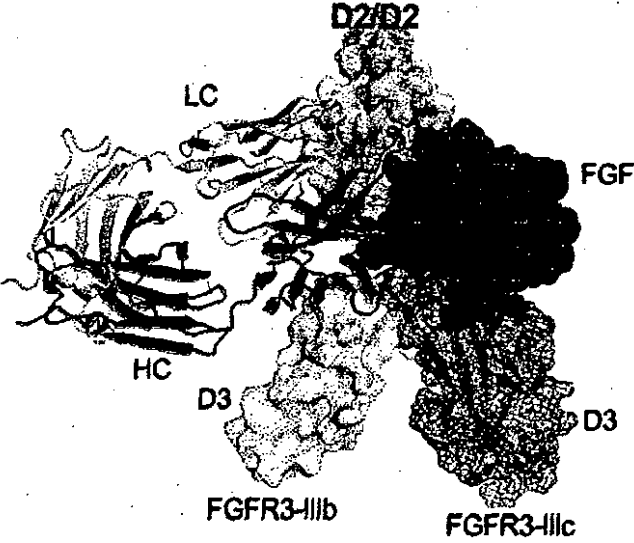
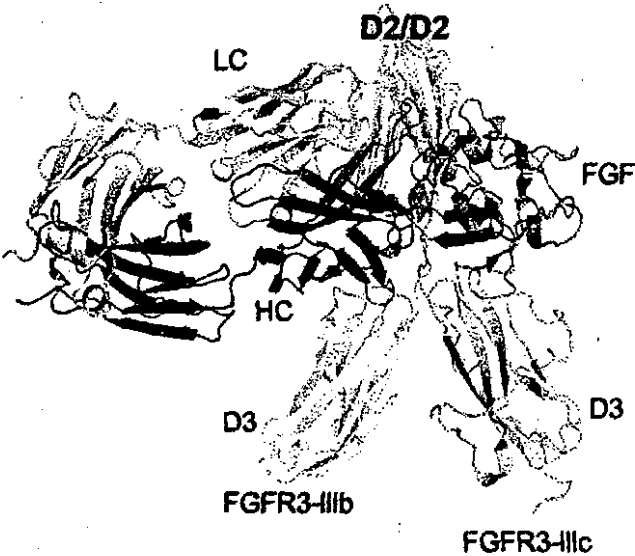
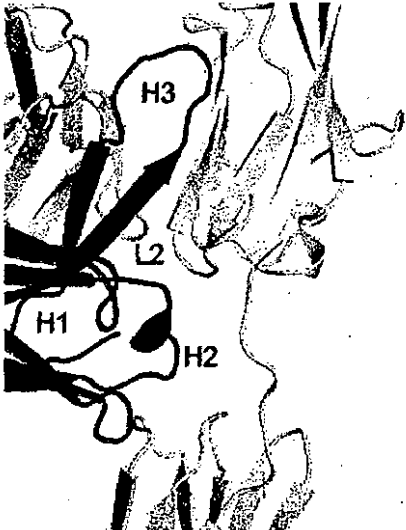
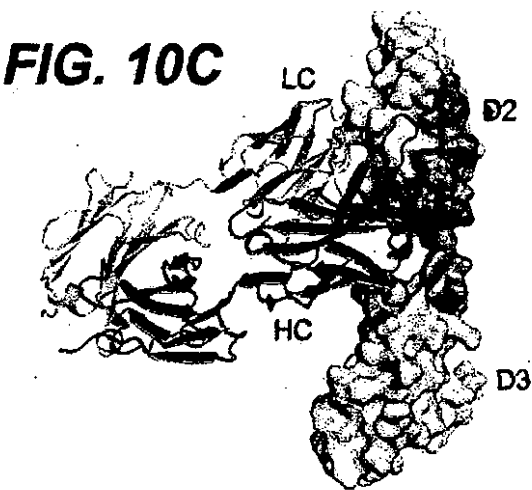
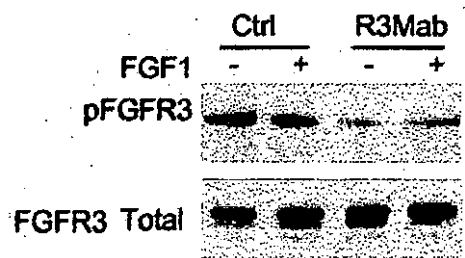
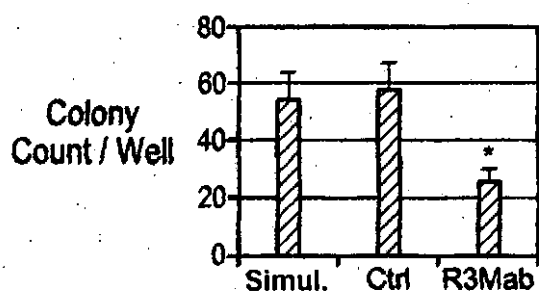
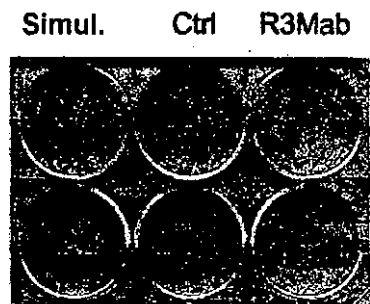
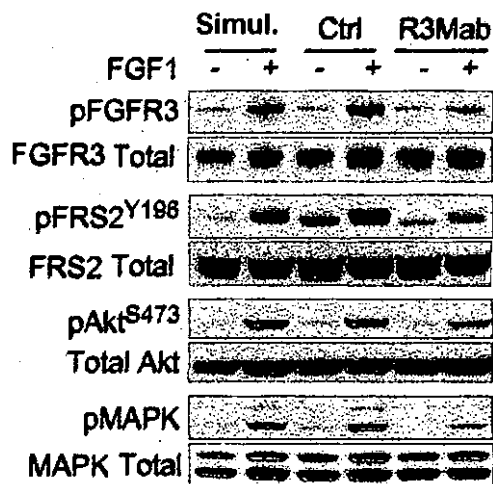
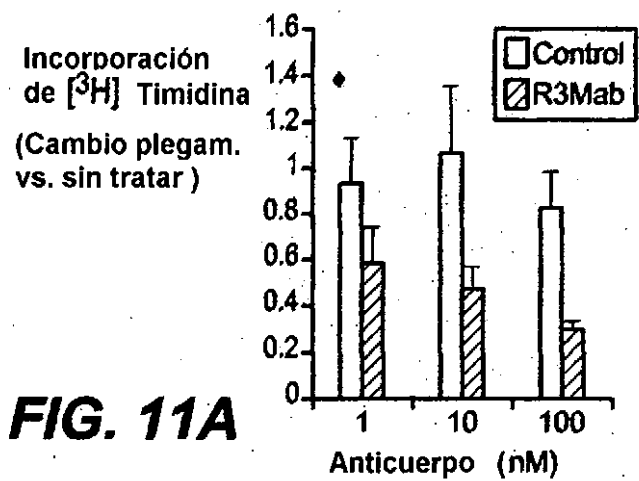


FIG. 10A

164	178	
FGFR3	LAVPAANTVRFRCPA	Péptido 3
FGFR1	HAVPAAKTVKFKCPS	
269	283	
FGFR3	SDVEFHCKVYSDAQP	Péptido 11
FGFR1	SNVEFMCKVYSDPQP	

FIG. 10B





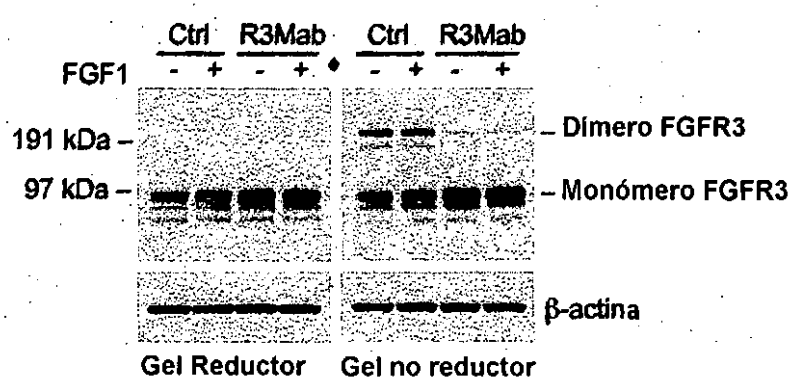


FIG. 12A

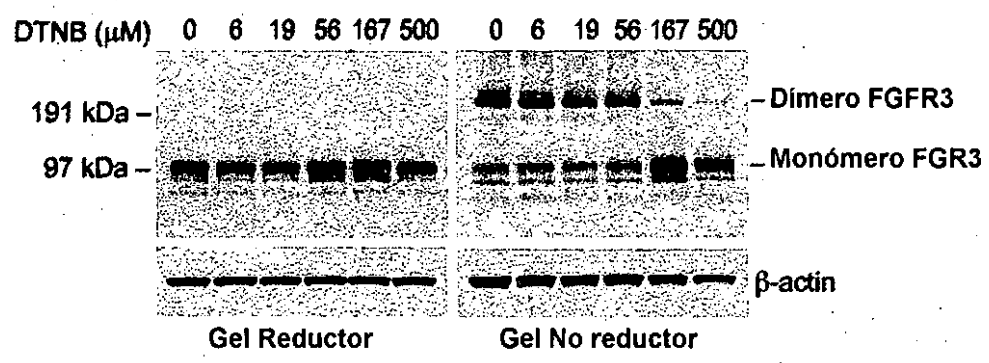


FIG. 12B

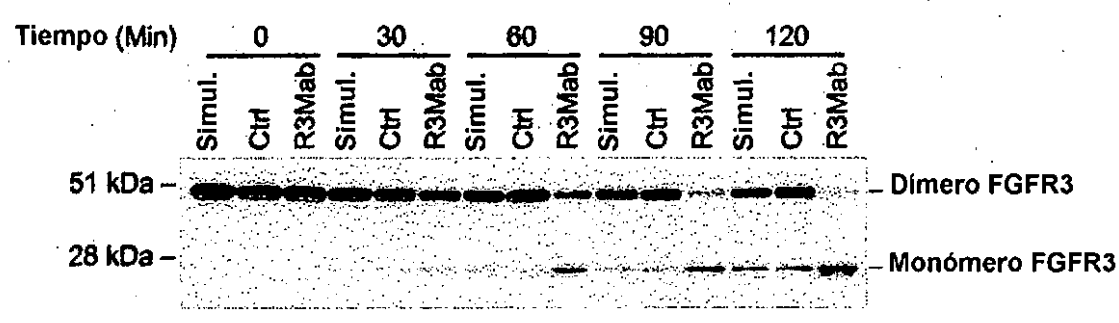


FIG. 12C

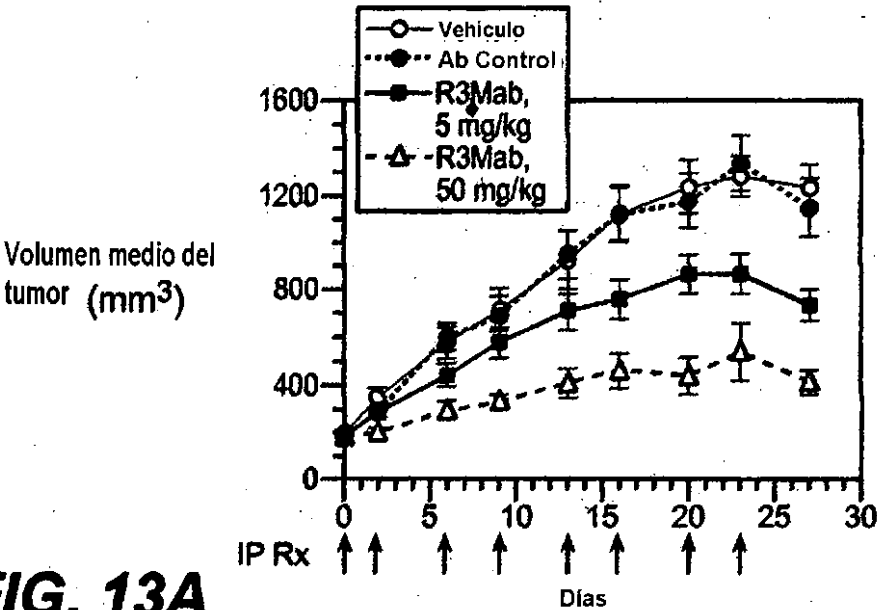


FIG. 13A

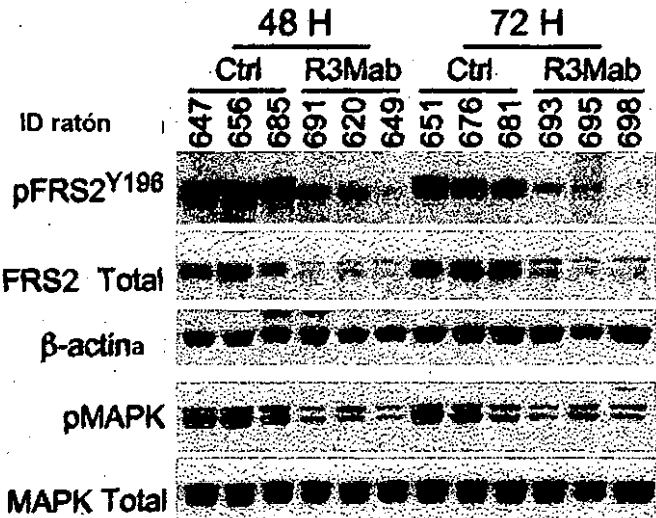


FIG. 13B

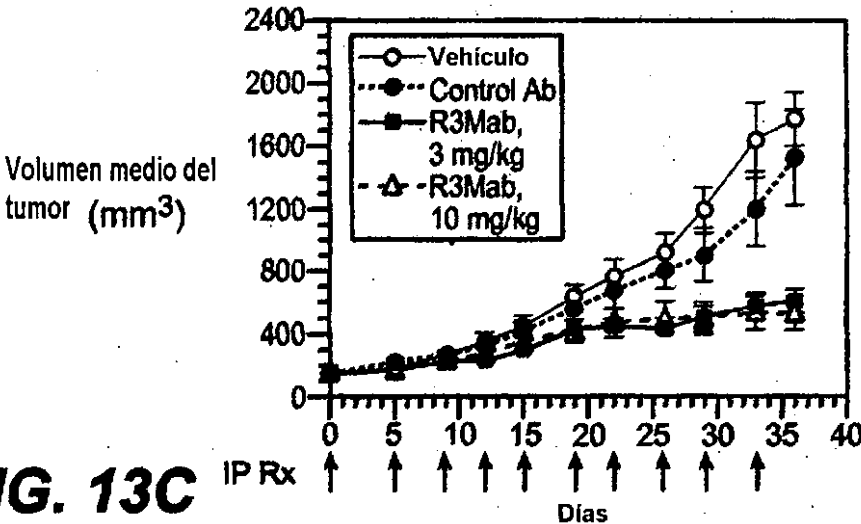


FIG. 13C

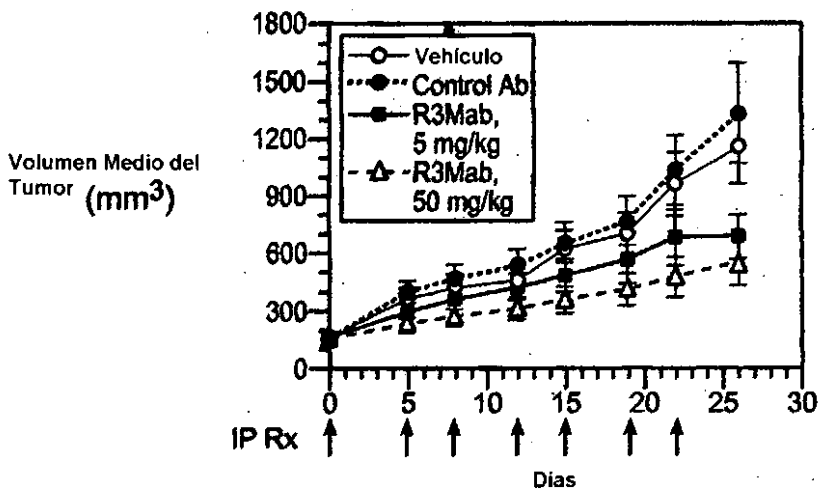


FIG. 13D

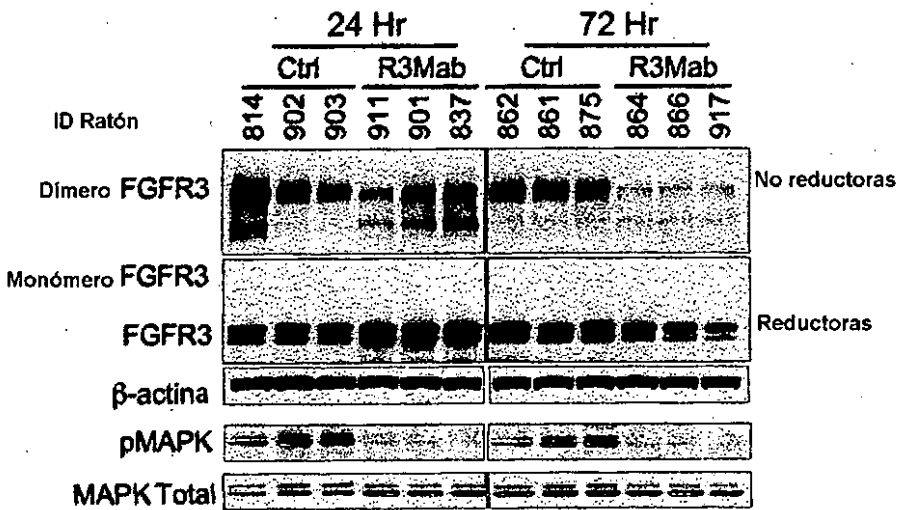


FIG. 13E

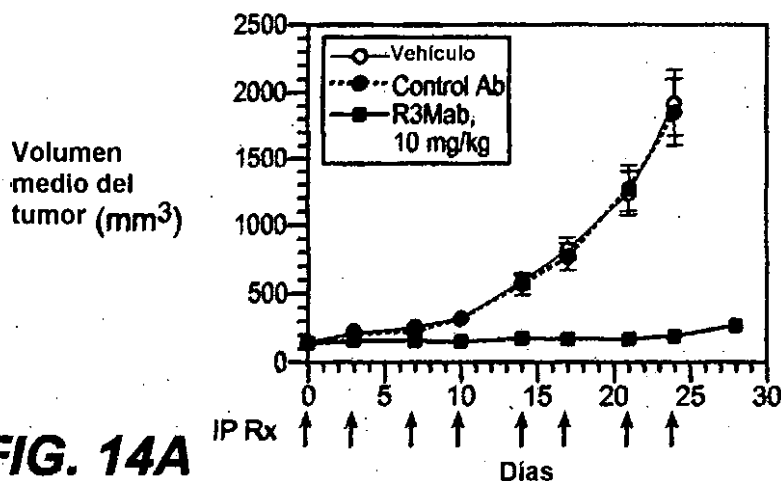


FIG. 14A

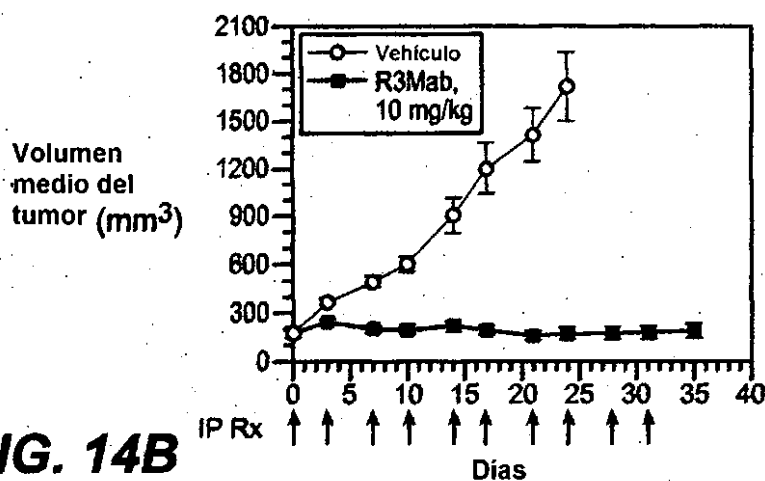


FIG. 14B

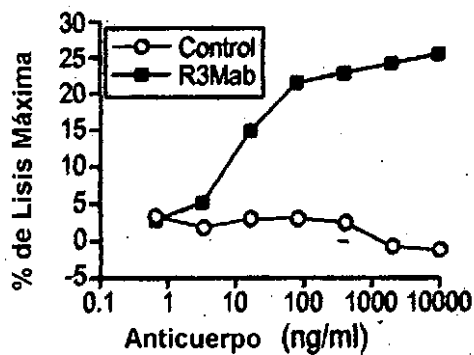


FIG. 14C

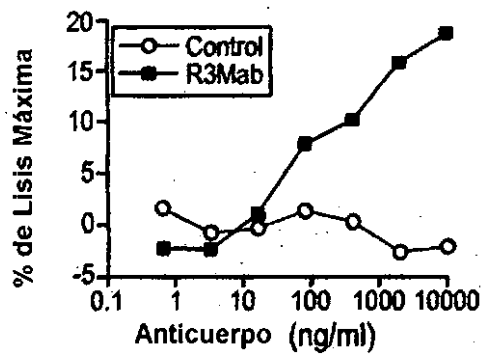


FIG. 14D

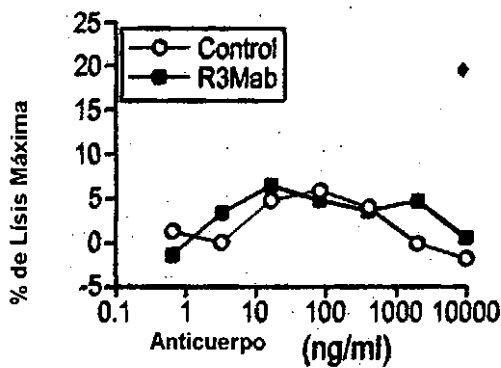


FIG. 14E

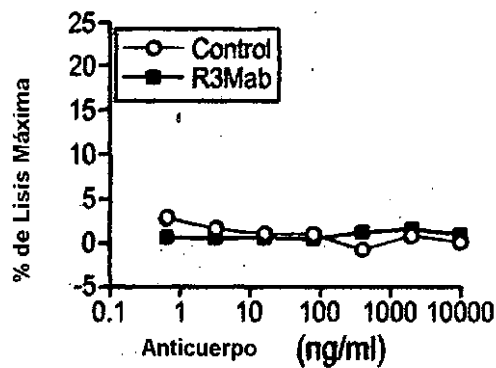


FIG. 14F

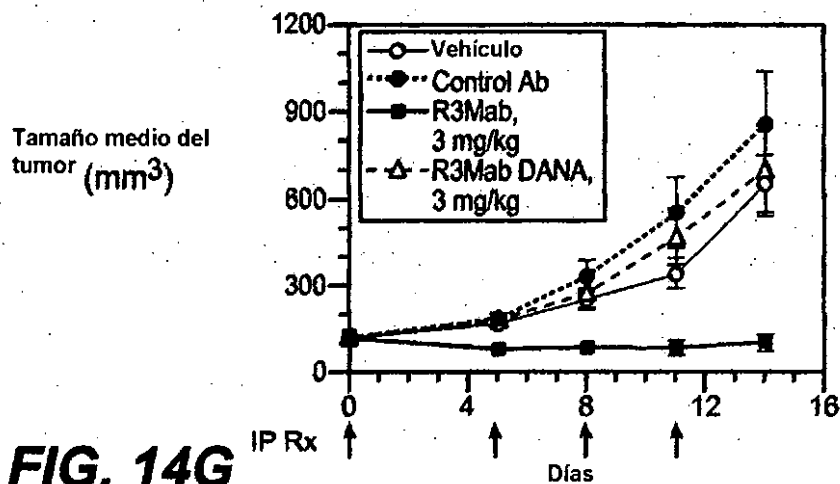


FIG. 14G

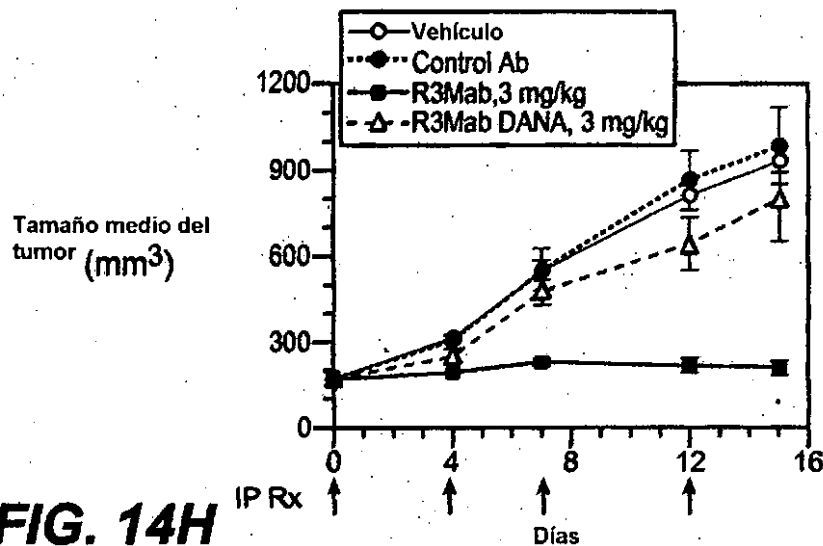


FIG. 14H

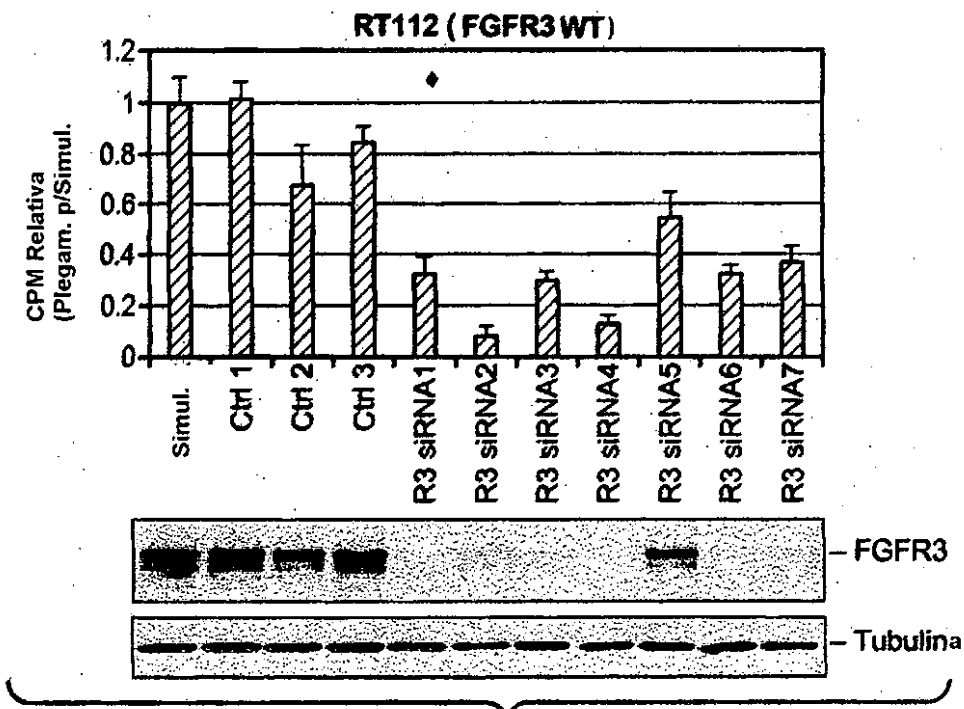


FIG. 15A

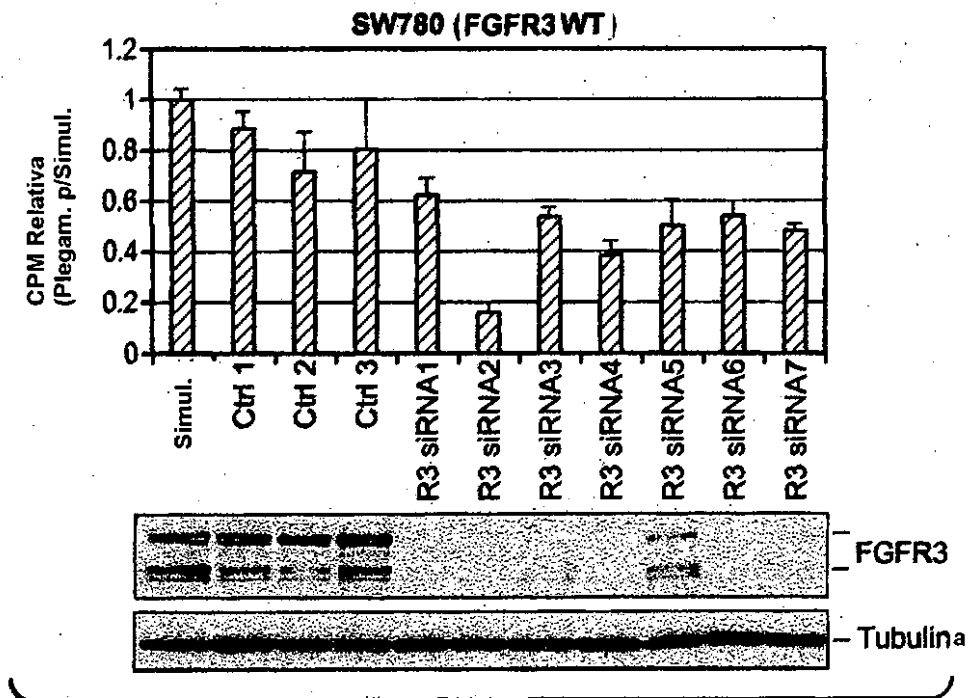


FIG. 15B

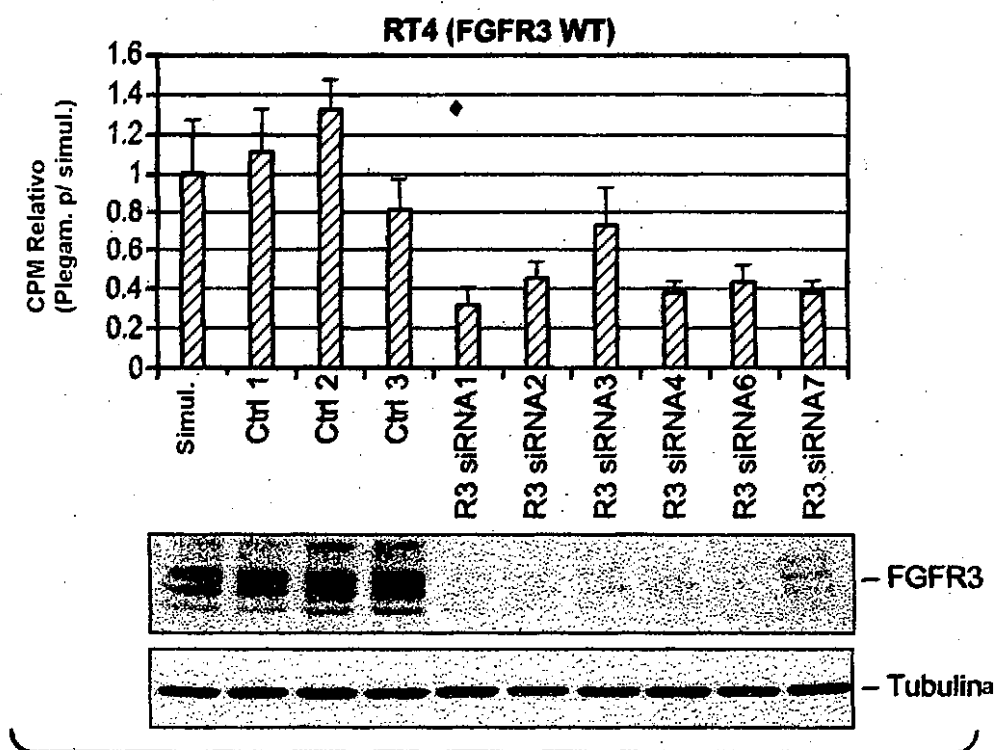


FIG. 15C

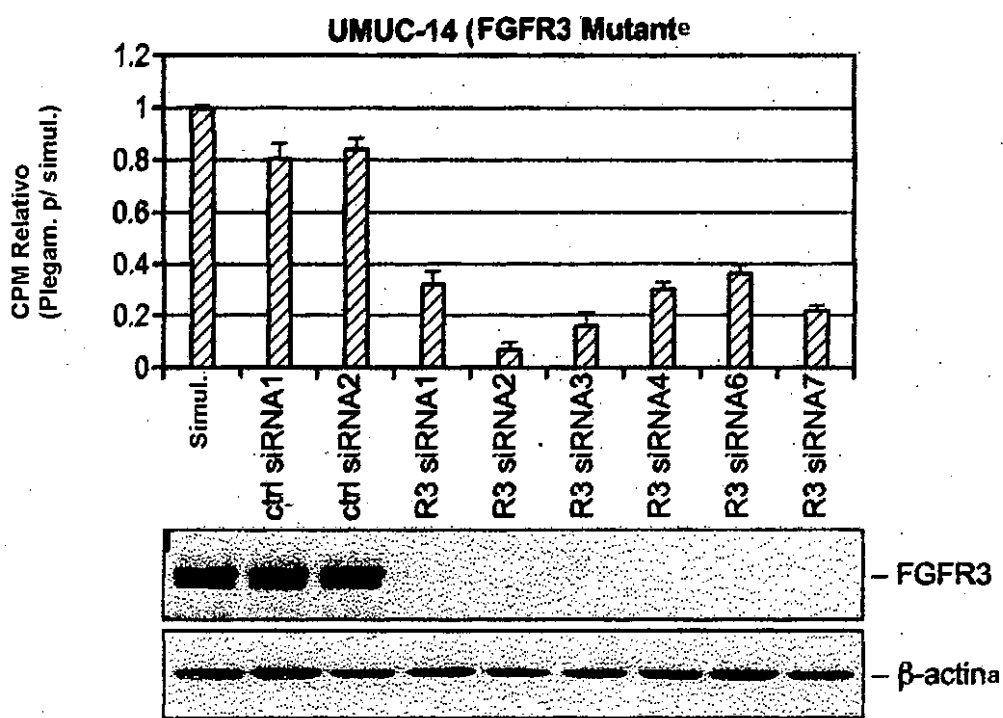


FIG. 15D

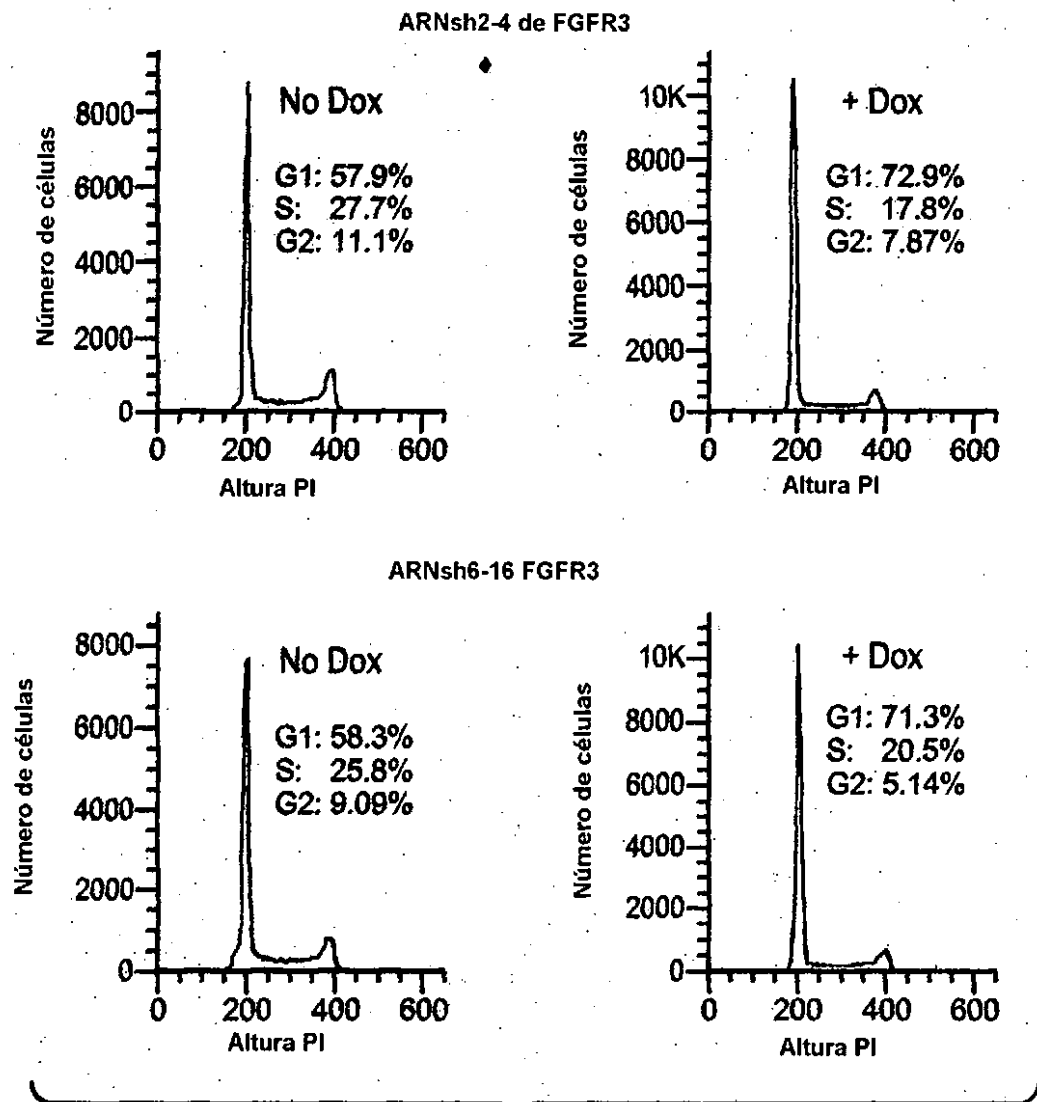
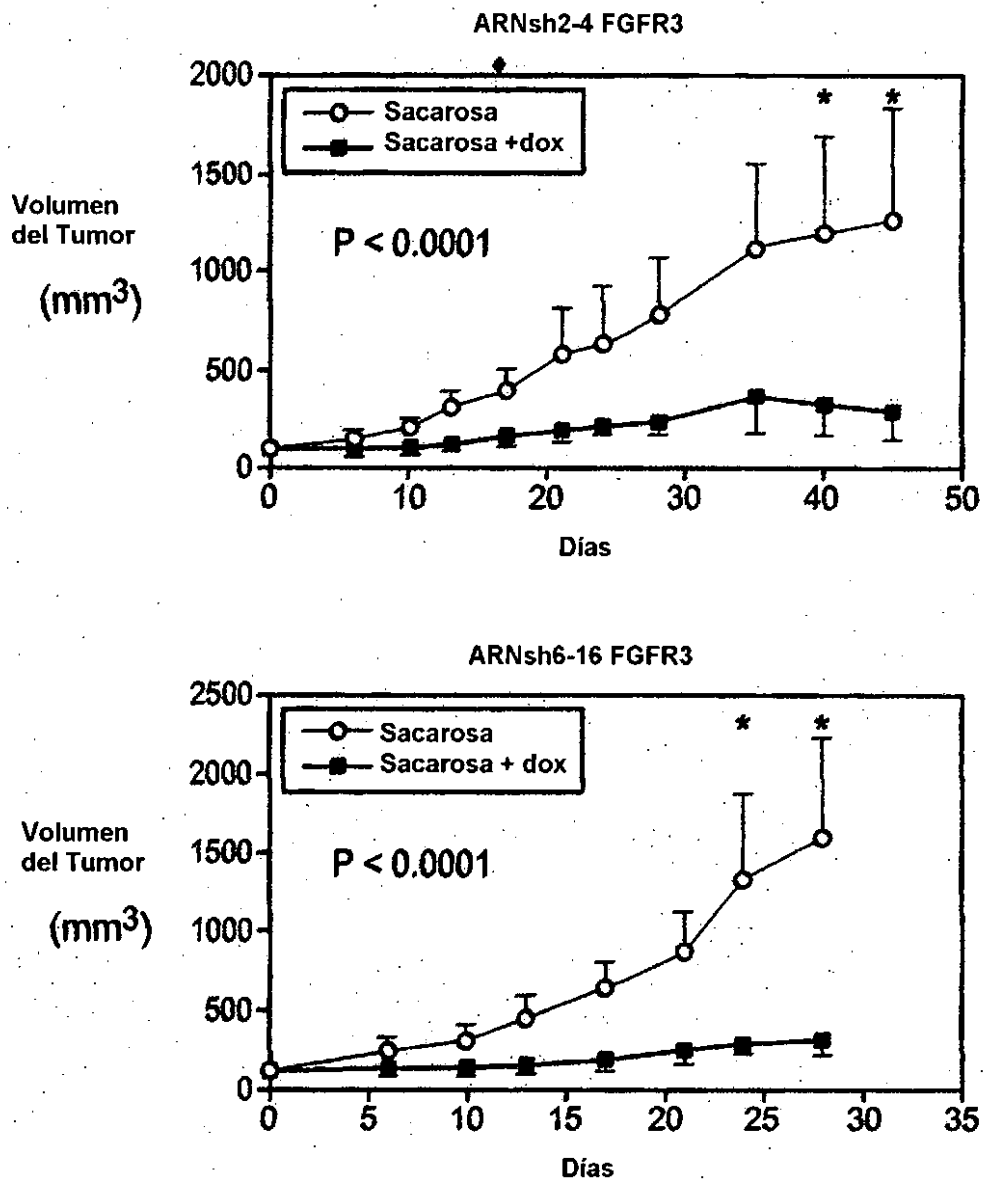


FIG. 16A

**FIG. 16B**

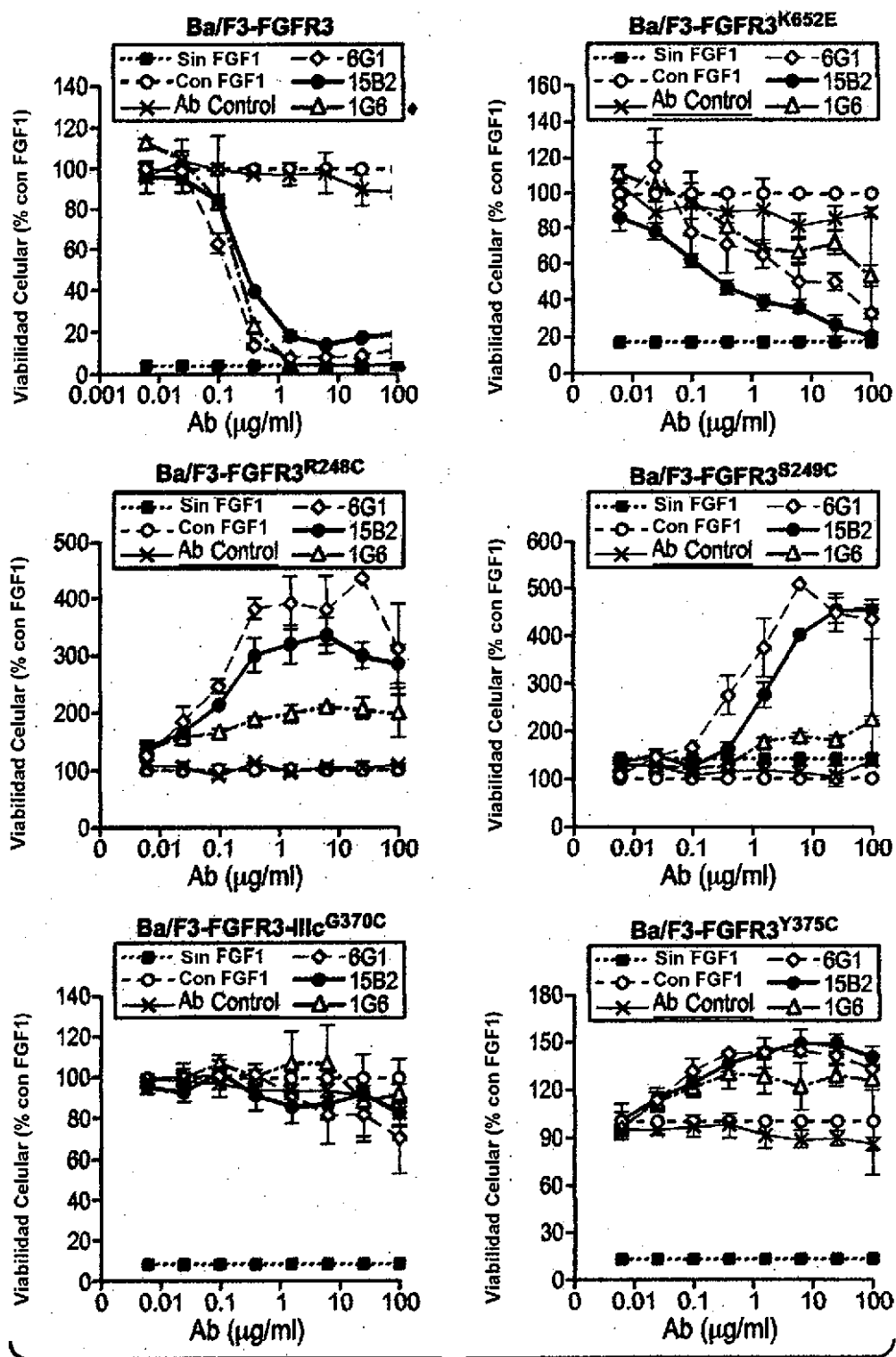


FIG. 17

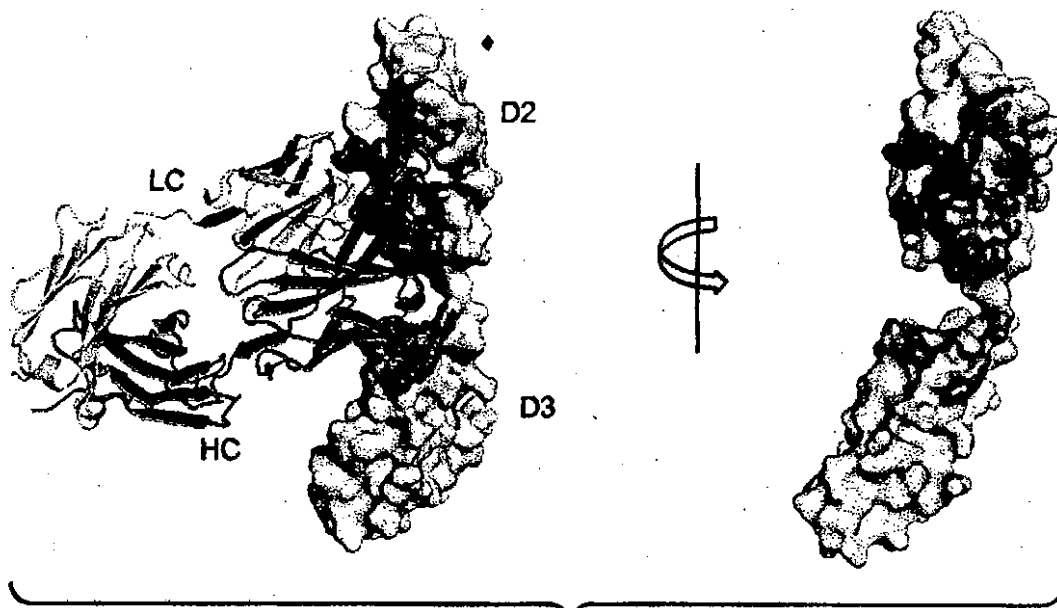


FIG. 18A

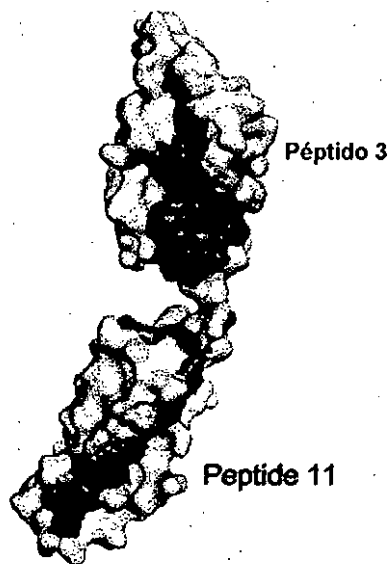


FIG. 18B

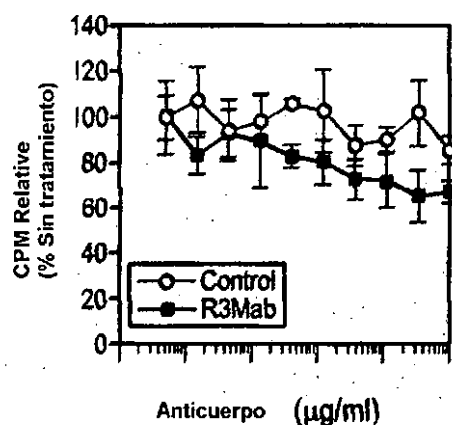


FIG. 19A

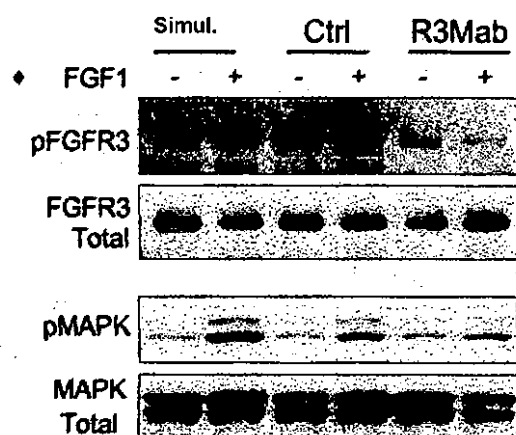


FIG. 19B

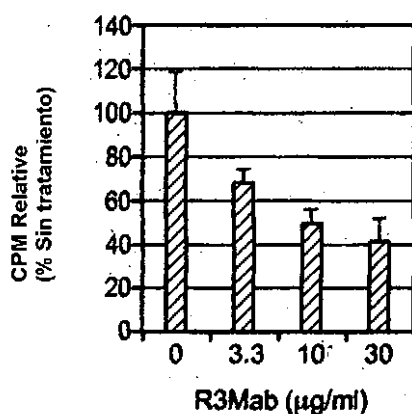


FIG. 19C

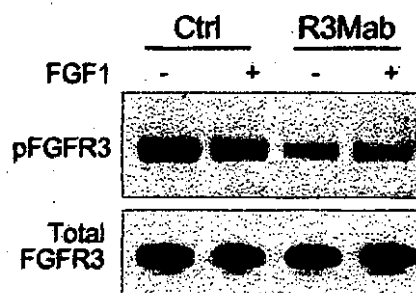


FIG. 19D

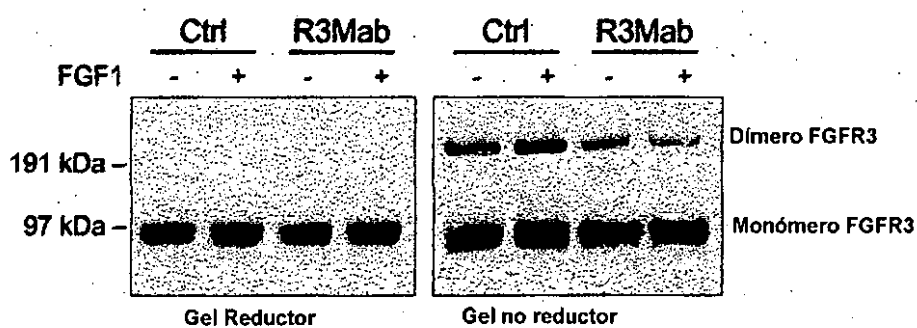


FIG. 19E

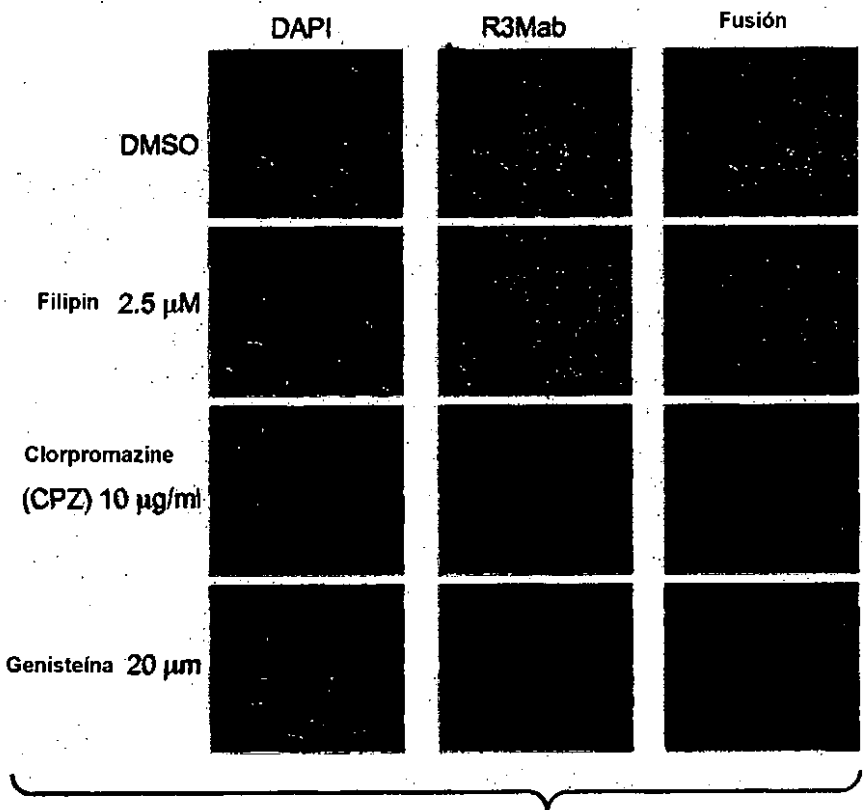


FIG. 20A

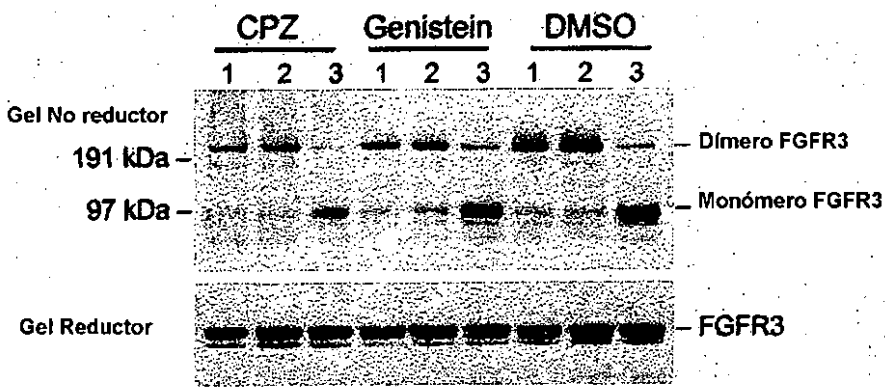


FIG. 20B

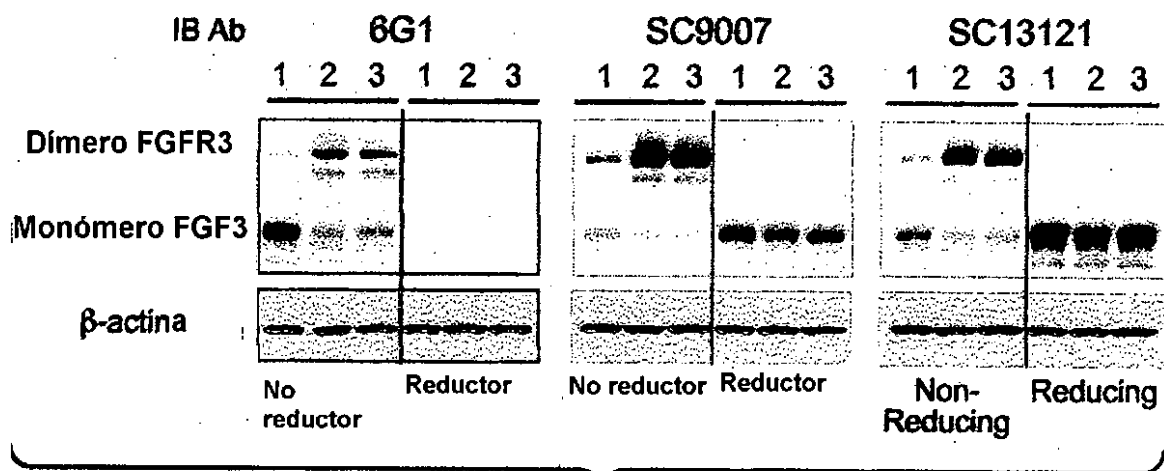
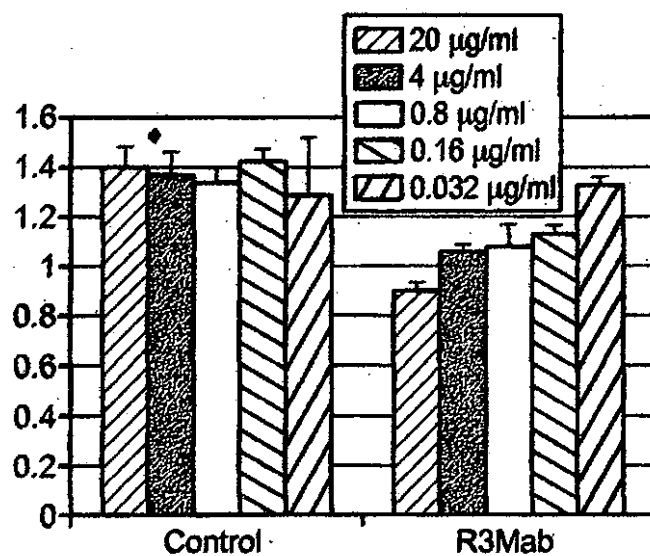


FIG. 21

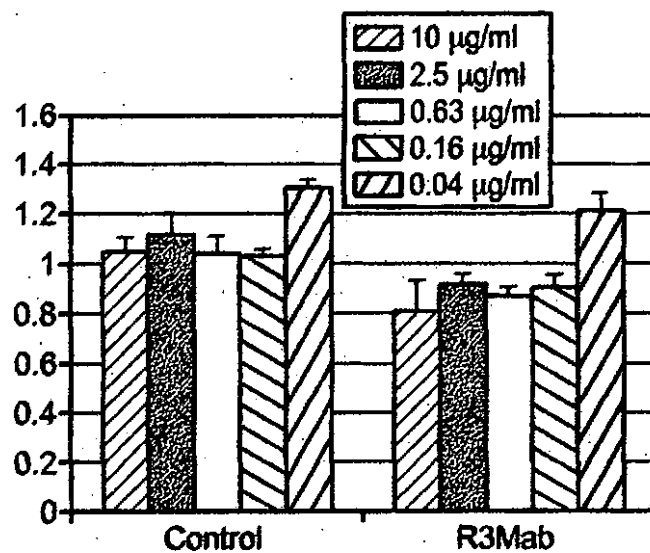
CPM Relativo
(Plegam. a Sin FGF9)

FIG. 22A



CPM Relativo
(Plegam. a Sin FGF9)

FIG. 22B



CPM Relativo
(Plegam. a sin
tratamiento)

FIG. 22C

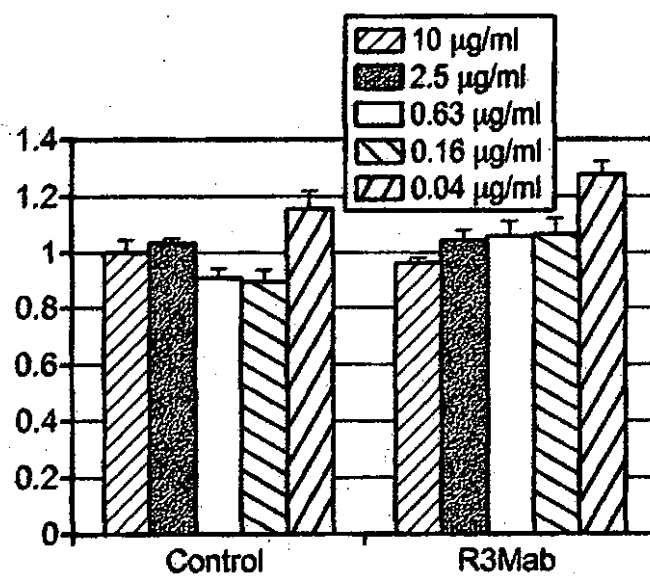


FIG. 23A

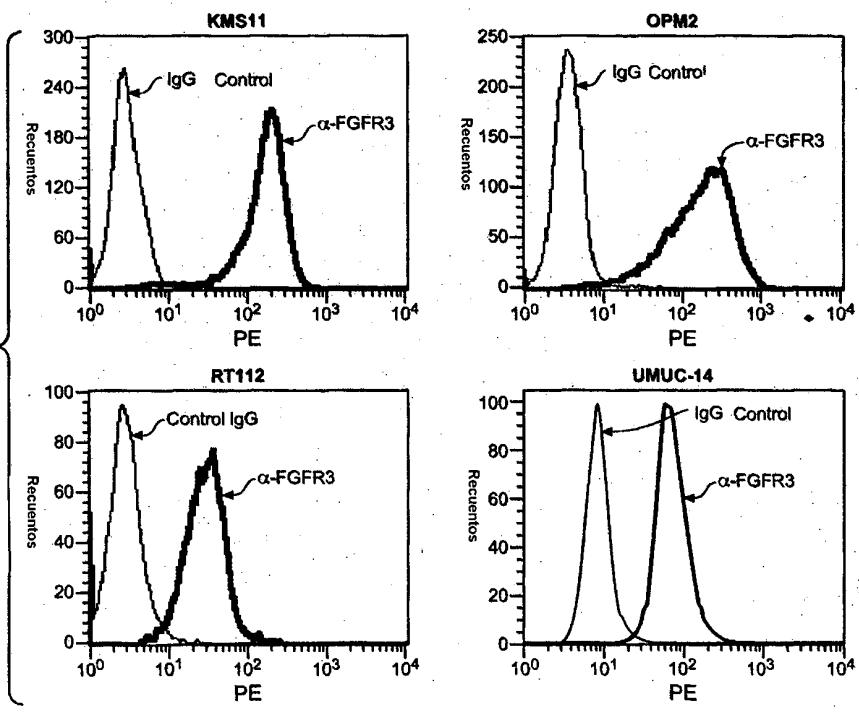
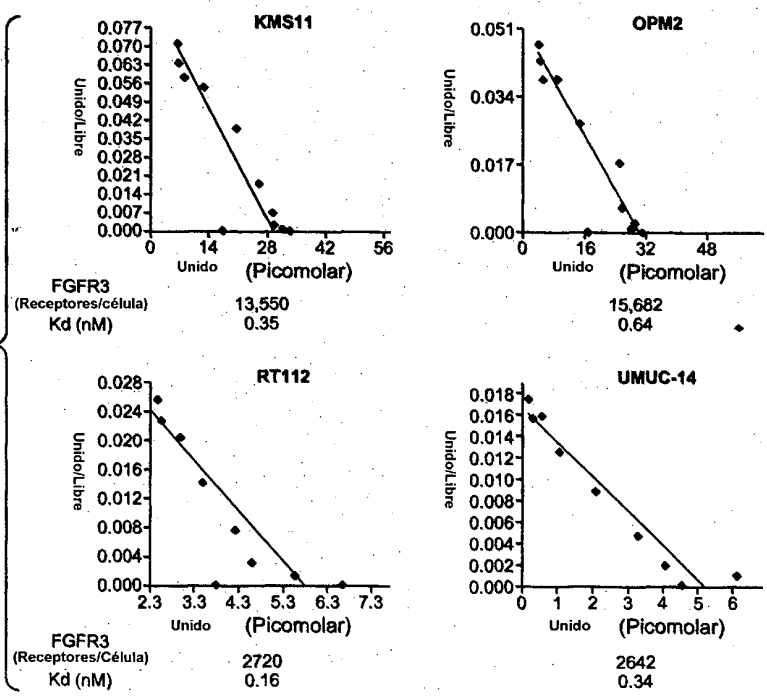


FIG. 23B



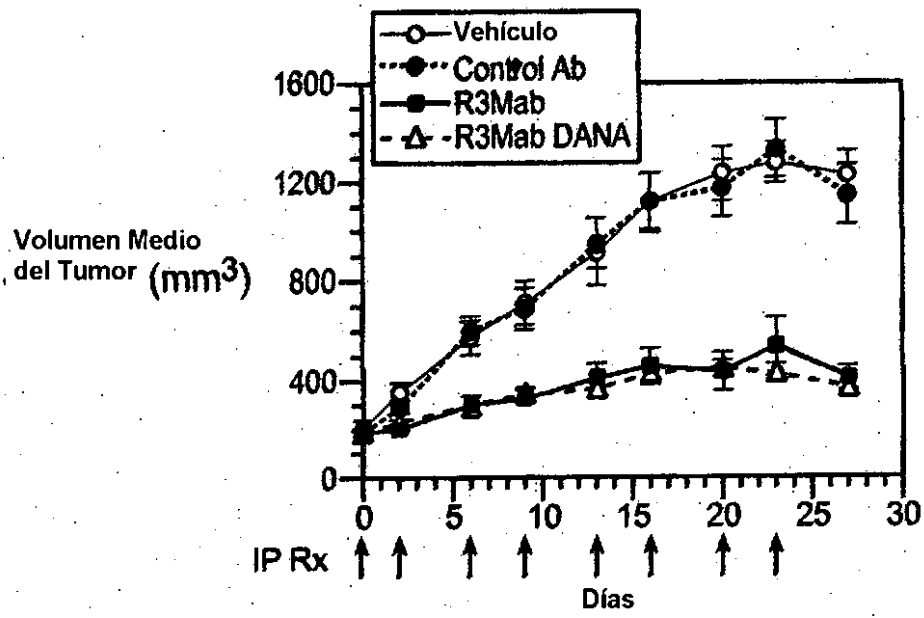


FIG. 24A

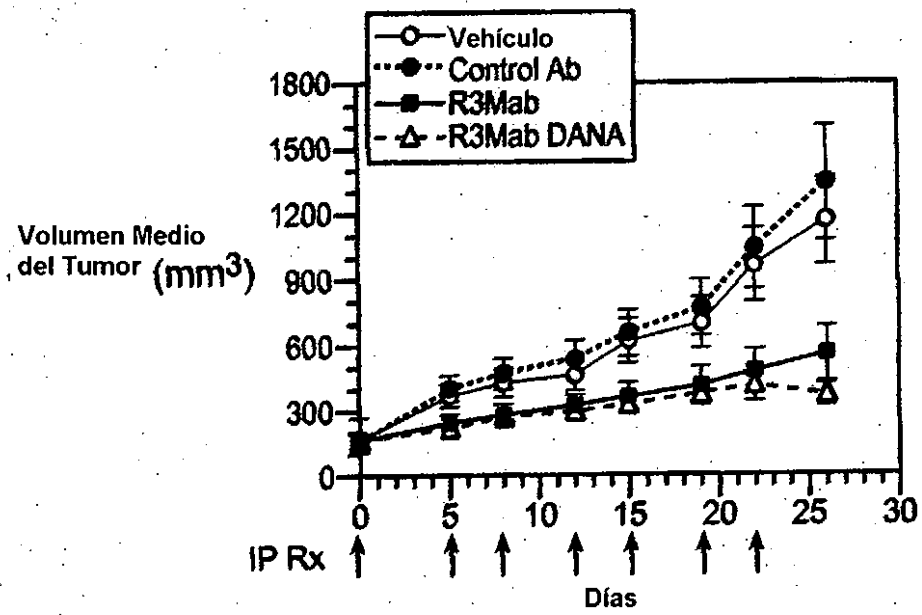


FIG. 24B

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros)

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciliado(s) en

domiciled in

South San Francisco, California 94080-4990
USA

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas, acciones de caducidad, cancelación y nulidad, acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios, demandas penales, acciones de competencia desleal, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares;

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses; action of unfair competition; criminal proceedings; actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses; con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law; renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistirse, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar substitutiones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en

South San Francisco, California

hoy de de 2005

Granted and signed in USA

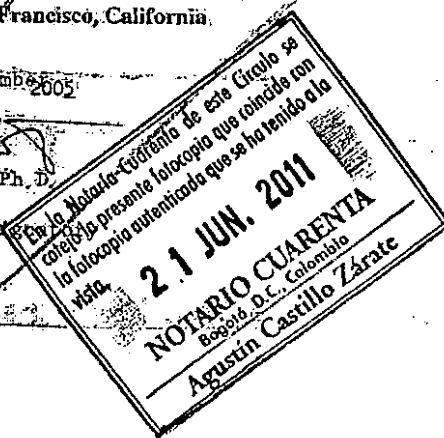
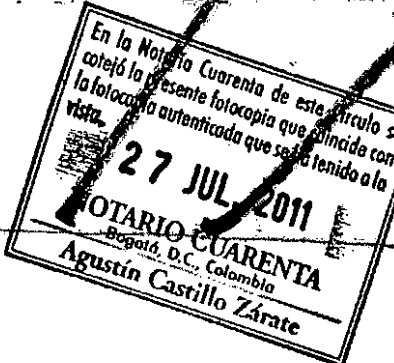
this 6th day of December 2005

Firma

Signature

Nombre
Cargo

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

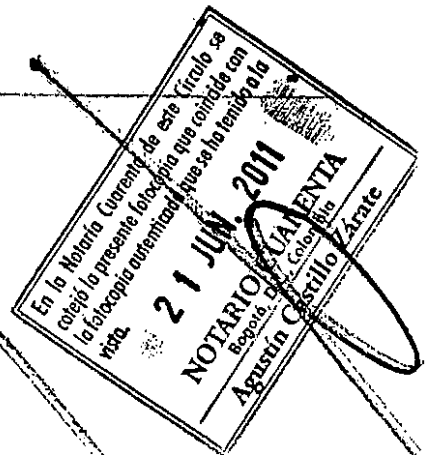
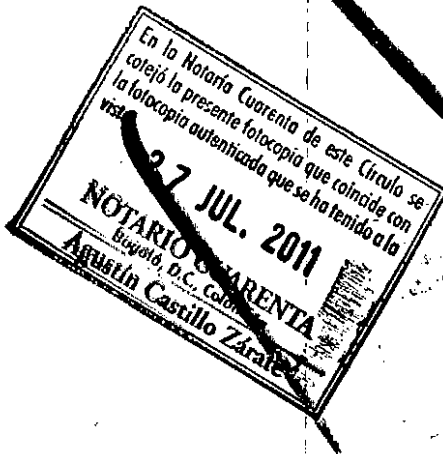
August 27, 2002

Dated

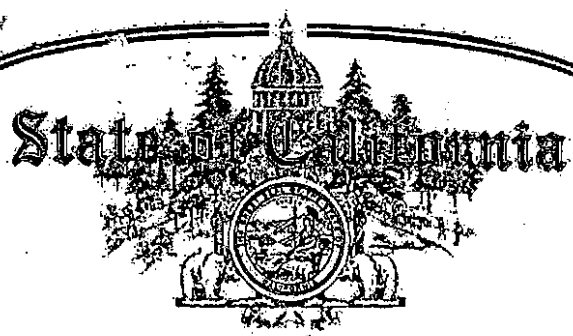
Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



15:77.408



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. Country: United States of America
This public document
- 2. has been signed by AIDA MIGLAT GUIAM
- 3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
- 4. bears the seal/stamp of AIDA MIGLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

- 5. At Sacramento, California
- 6. the 15th day of December, 2005
- 7. by Deputy Secretary of State, State of California
- 8. No. 267083
- 9. Seal/Stamp:

10. Signature.



[Signature]
Secretary of State



WP-21-93 (REV. 4-05)

OSP-06 00772

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss:

On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guian

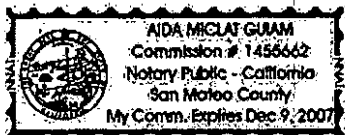
personally appeared Timothy R. Schwartz

Name and Title of Officer (i.e., "Jula Doe, Notary Public")

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

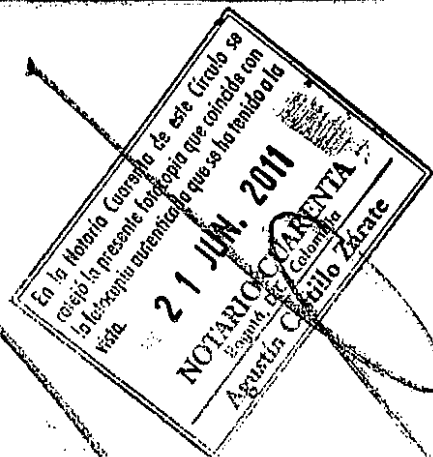
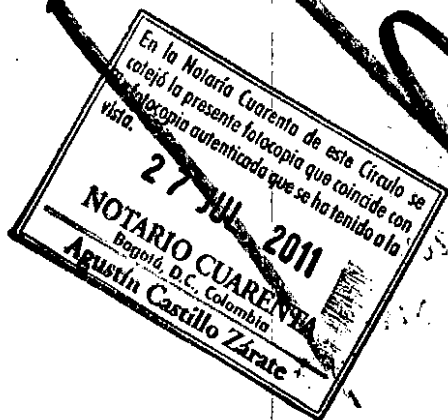
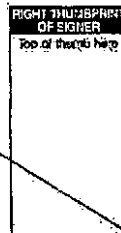
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer is Representing: _____



93 33

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por Genentech, Inc. domiciliada en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya de 5 de Octubre de 1961)

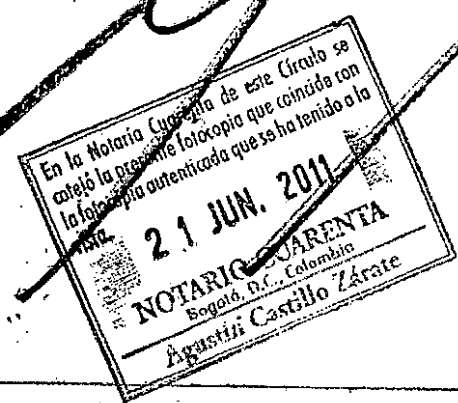
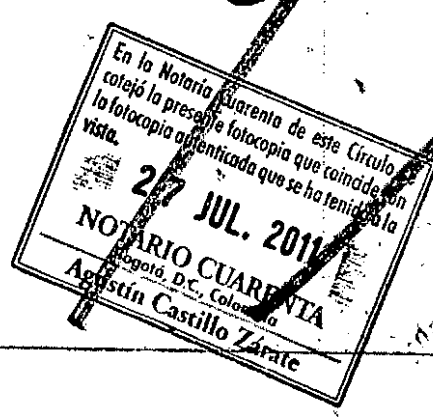
1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California.

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mí, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mí en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mí que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Atestigua mi firma y sello oficial.

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y reedición fraudulenta de este forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento:

Fecha del Documento:

Número de páginas:

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba:

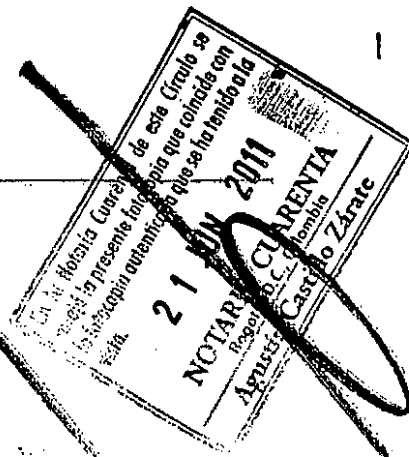
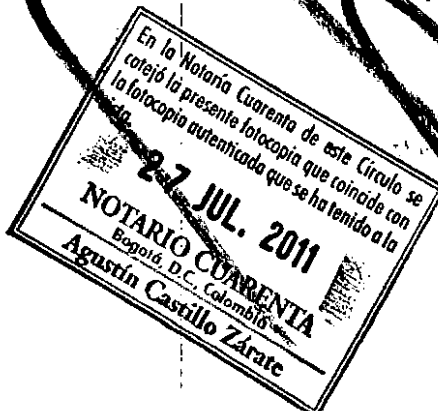
Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante:

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo - Título(s):
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro:

Huella índice
derecho del firmante:
Parte alta del dedo aquí

El firmante representa:



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

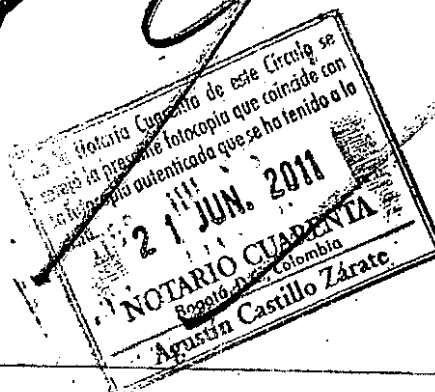
27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



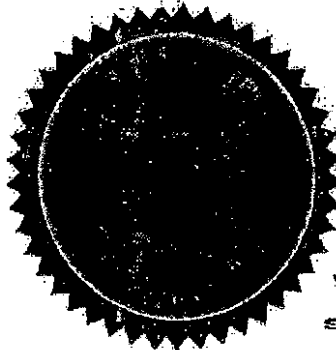
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

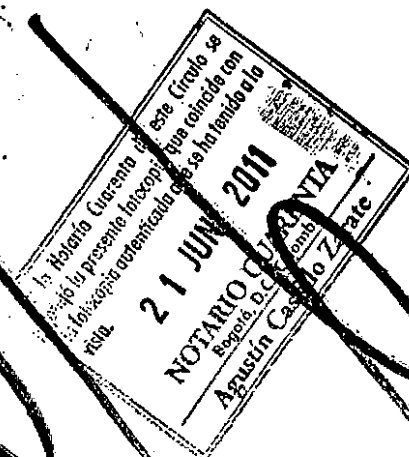
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

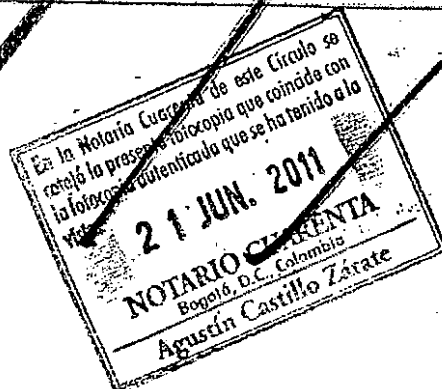
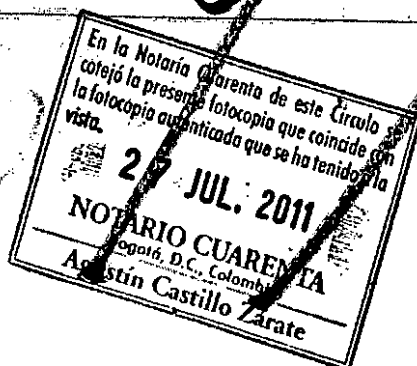
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor
 Harriet Smith Windsor, Secretary of State
 AUTHENTICATION 3900884

DATE: 05-24-05



AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

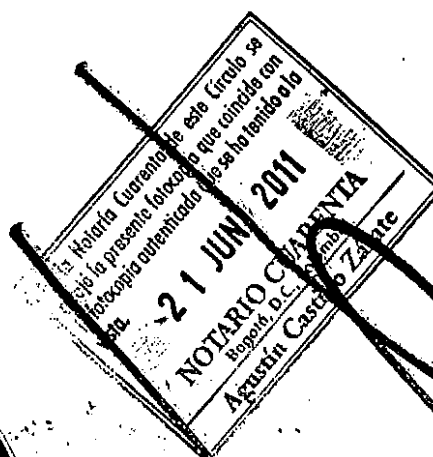
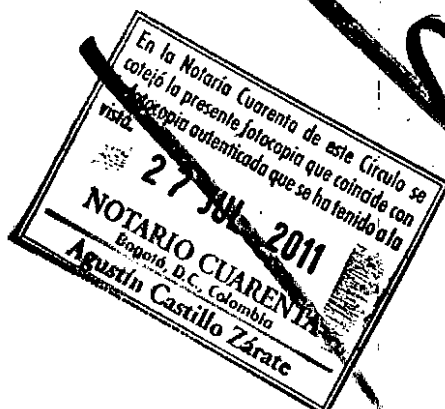
ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/29/2011
991302331 - 2112549



ARTICLE 4

SECTION 4.01. Capital Stock. (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

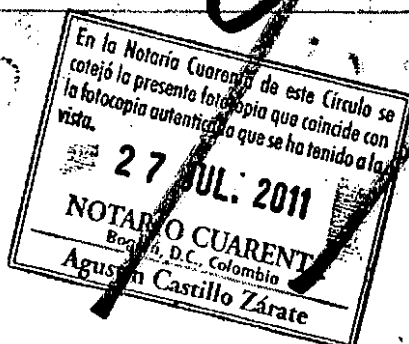
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. Common Stock. (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

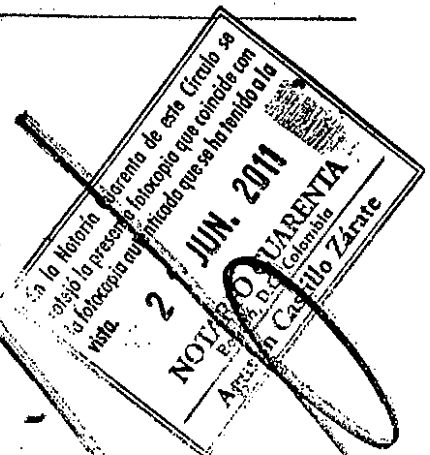
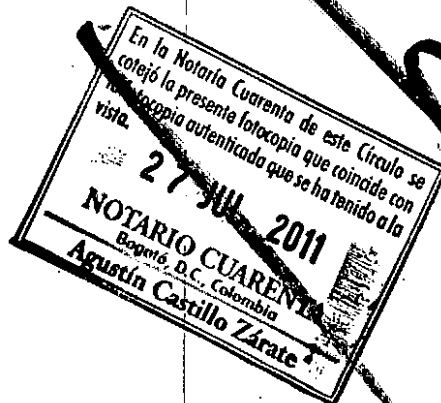
SECTION 4.03. Preferred Stock.

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

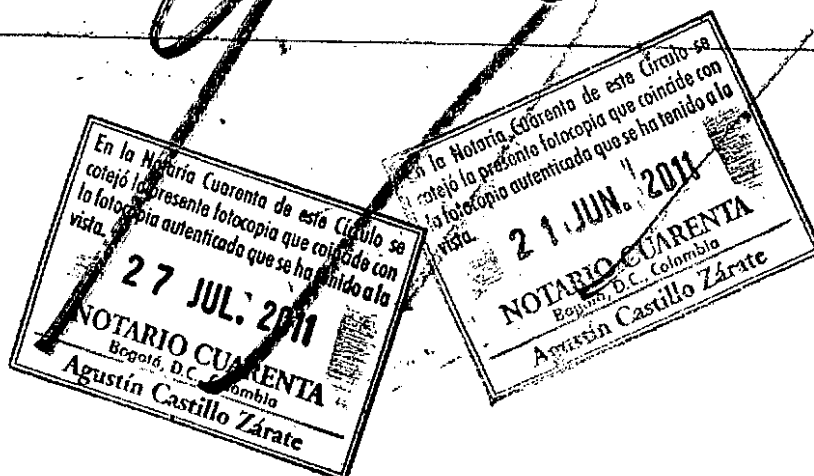
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

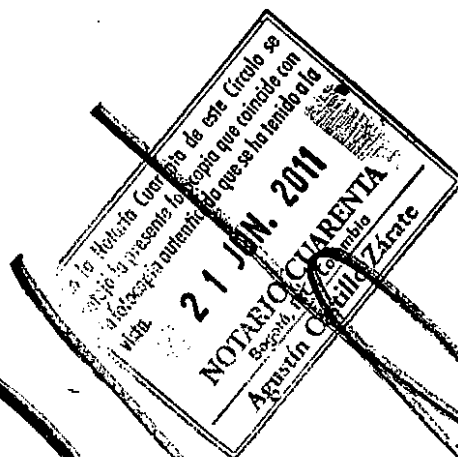
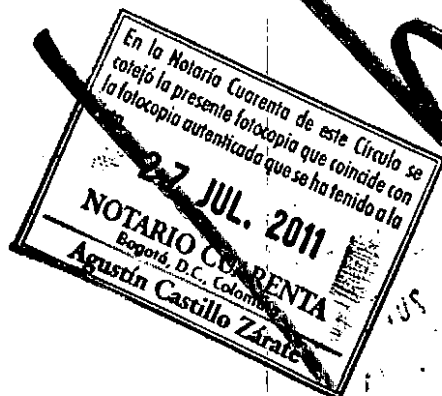
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(c) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(d) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

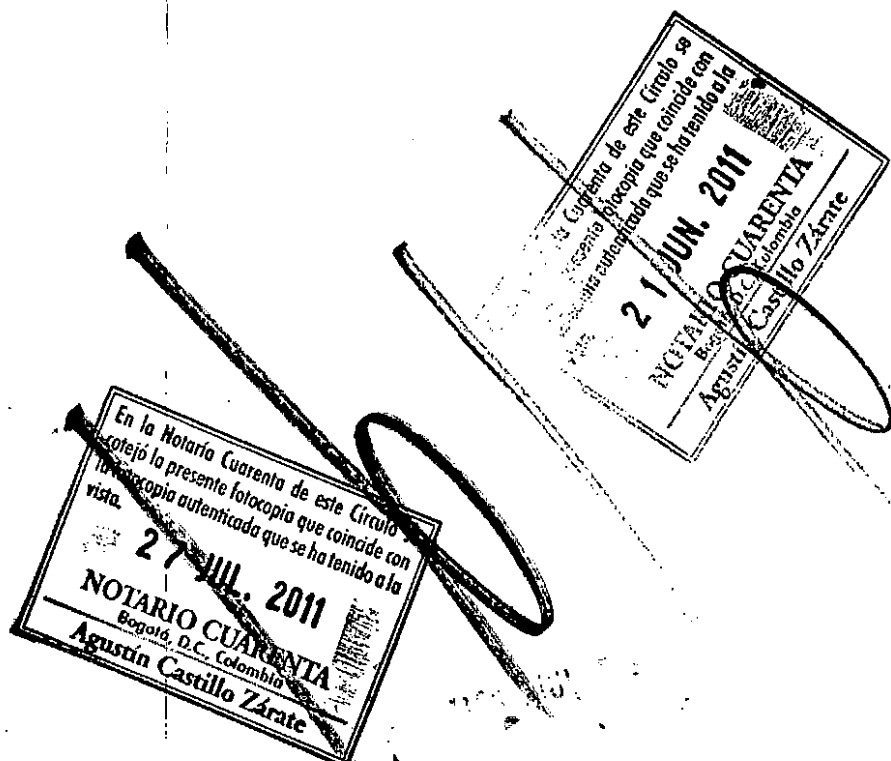
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. Deemed Consent of Stockholders. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

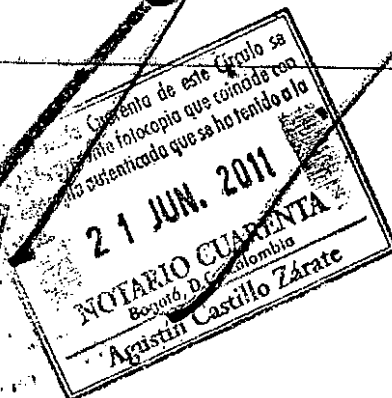
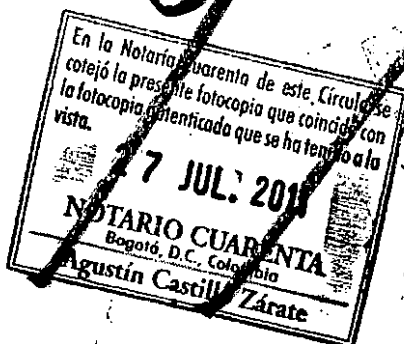
SECTION 8.05. Definitions. For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests; and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. Termination; Binding Effect. Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. Article 9. The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. Contracts Not Void. No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



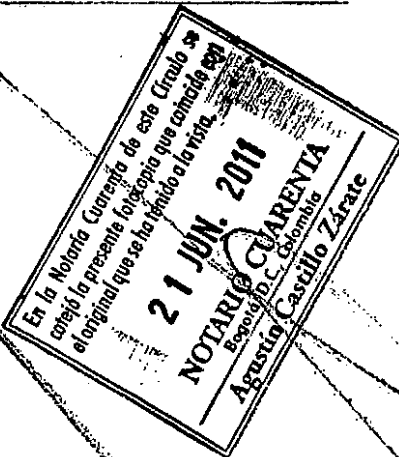
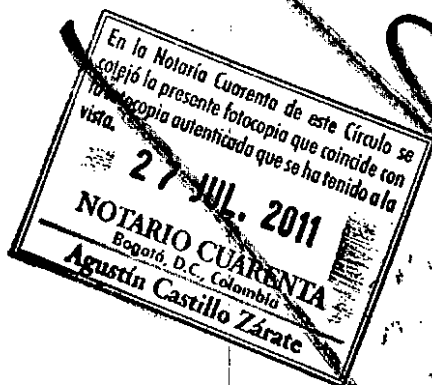
meeting of this Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

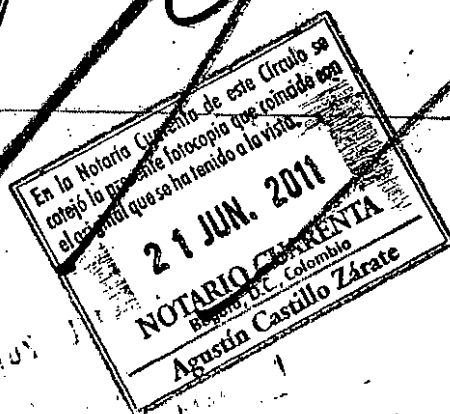
SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

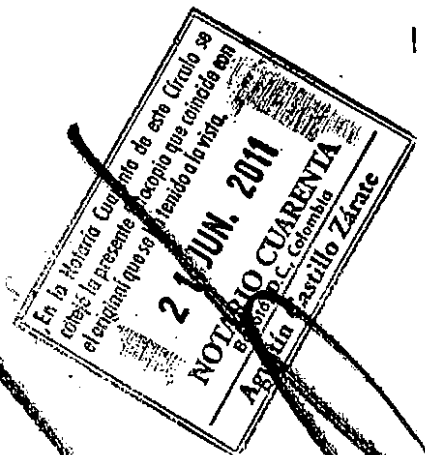
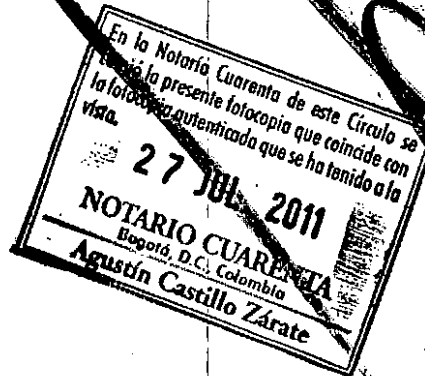
10



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

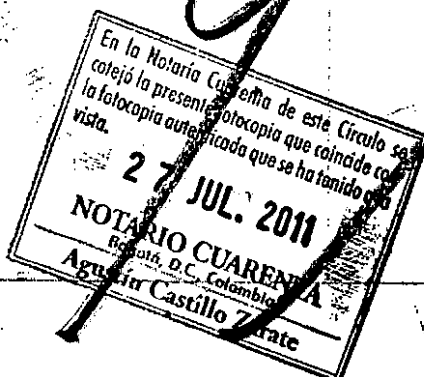
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware;
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005;
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware;
8. No. 0254030;
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

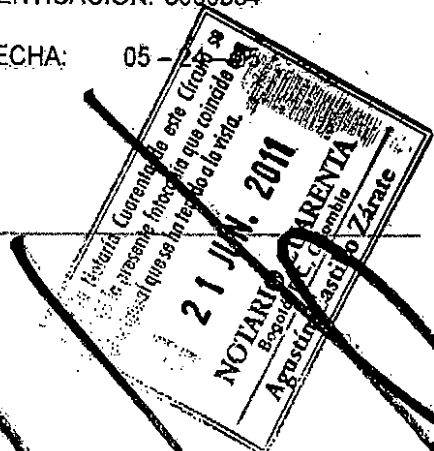
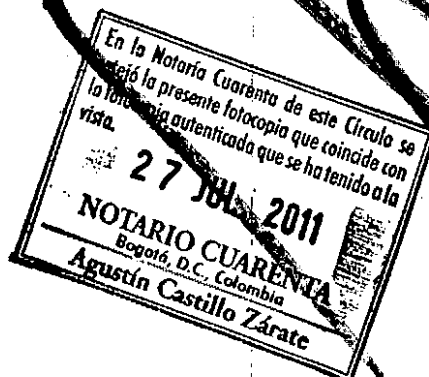


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO.

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A
REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL
VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA
MAÑANA.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 -



CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "Corporación"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

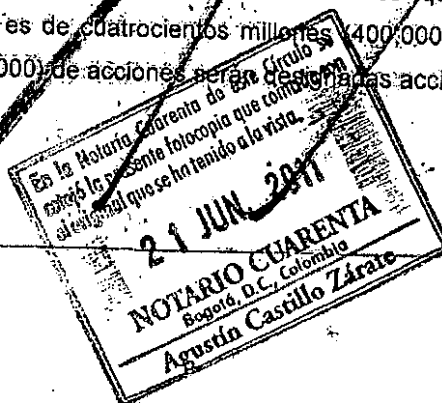
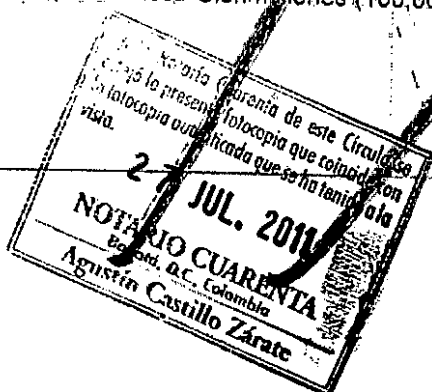
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de la Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede ser modificada la misma en adelante ("Delaware Law").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. Acciones de Capital. (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán las acciones



preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones, serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

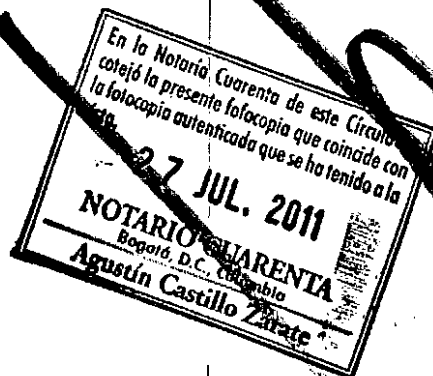
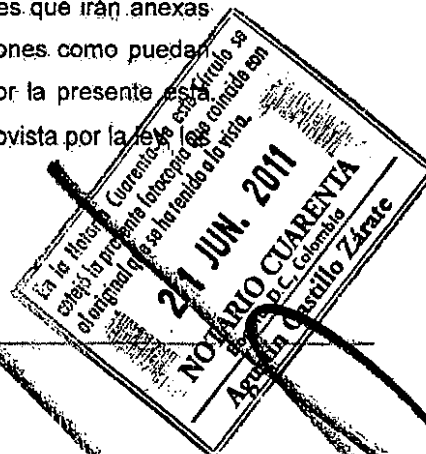
(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. Acción Común. (a) Emisión y Consideración. Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) Dividendos. Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. Acción Preferencial.

(a) Series y Límites de Variaciones entre Series. Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, número que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y la fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

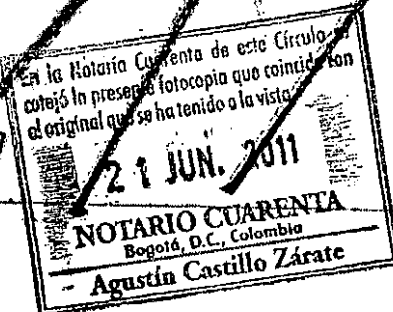
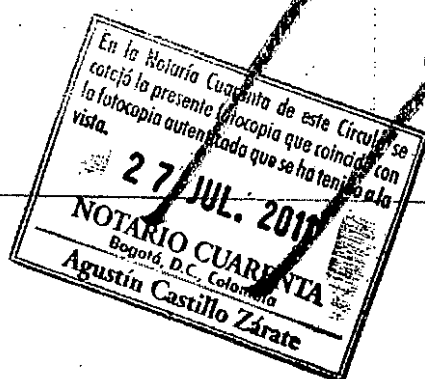
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntario o involuntario de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva está expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

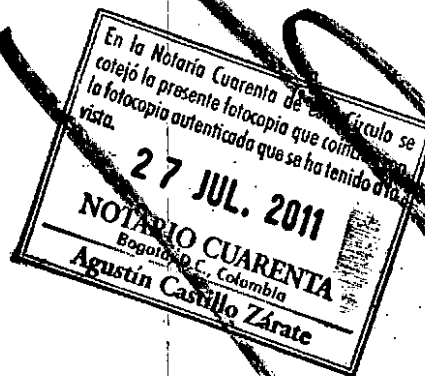
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier período cuando los accionistas de cualquier

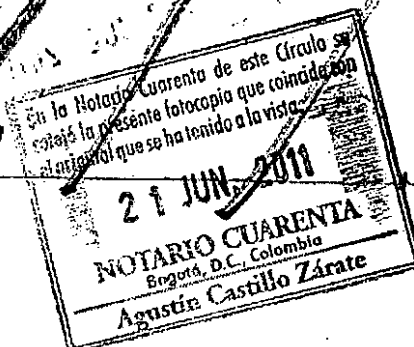
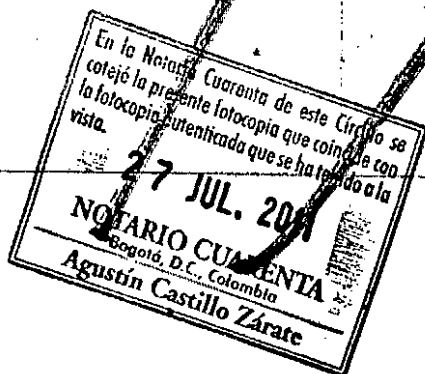


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal término, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o está amenazado de ser parte de, o está involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

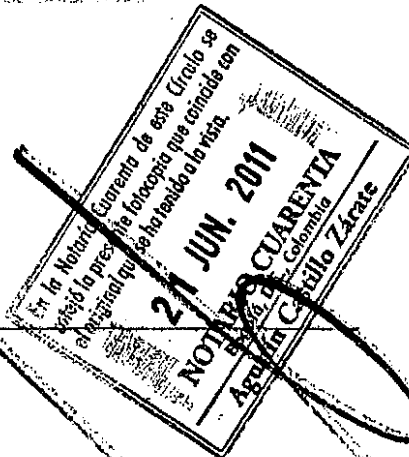
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

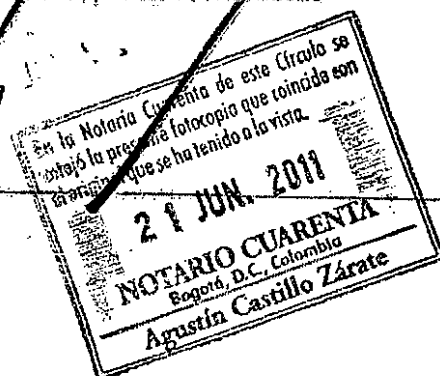
SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche*. Anticipándose a que la Corporación cese de ser una subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes, en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCIÓN 8.02. *Actividades en Negocios Similares*. Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiere conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

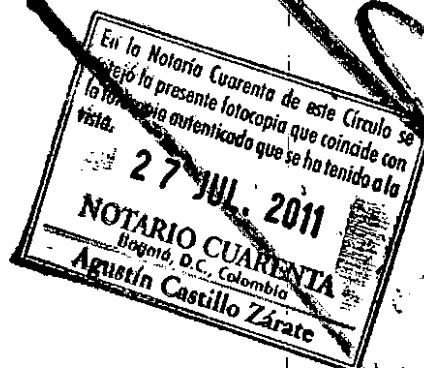


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiriera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya sea si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiriera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación) definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliadas**" (como se



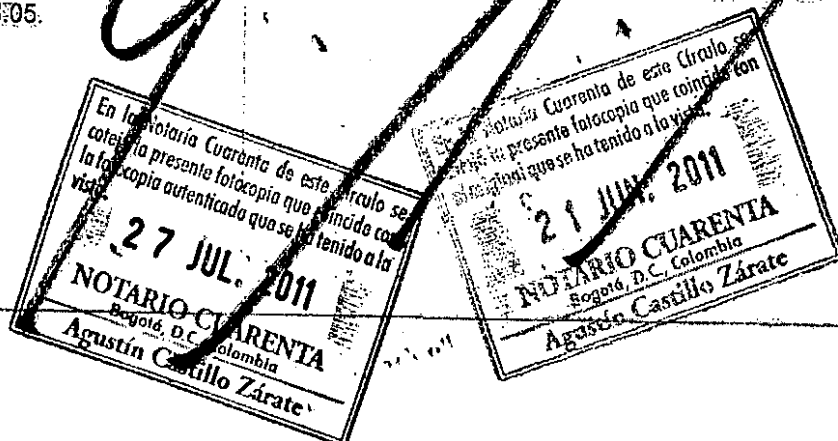
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cesé de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que sea director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07, *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01, *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo o anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "Corporación" y "Roche" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

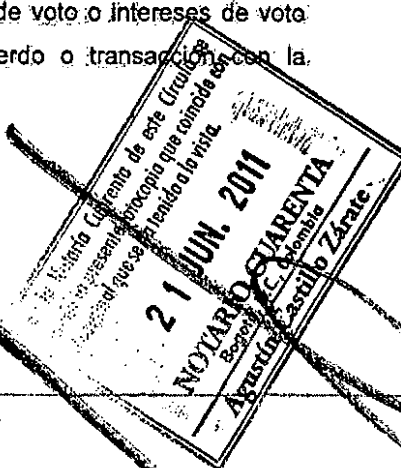


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

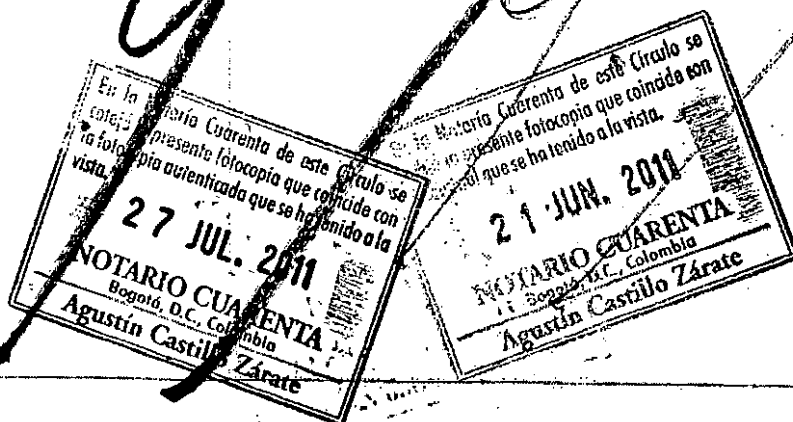
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

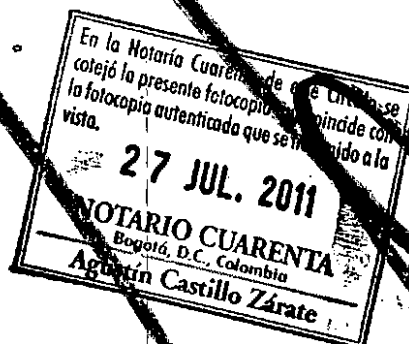
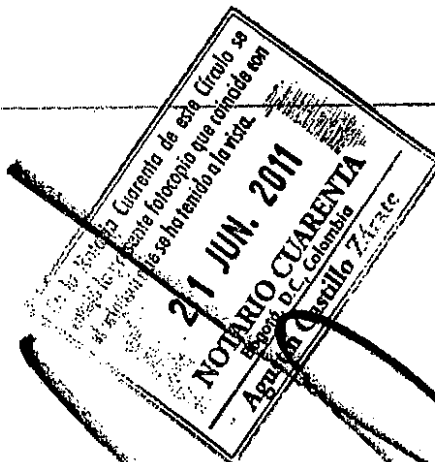
GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice-President, General Counsel
and Secretary

35841



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

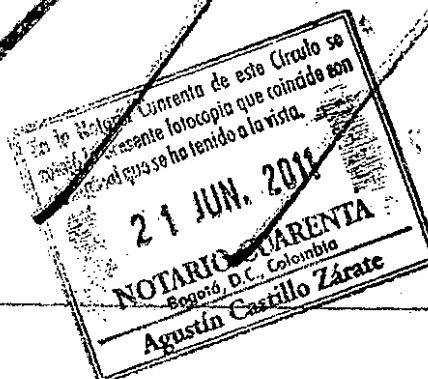
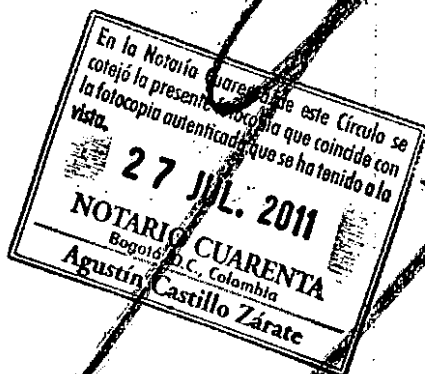
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

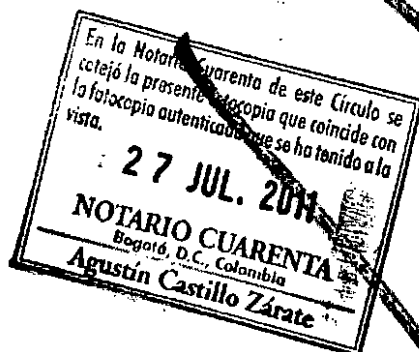
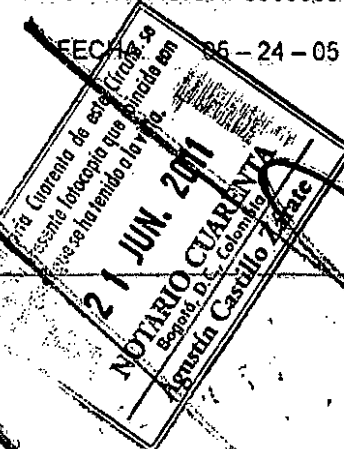


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A
REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL
DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

RECIBO 06-24-05



CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

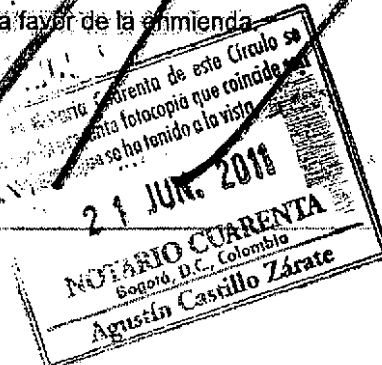
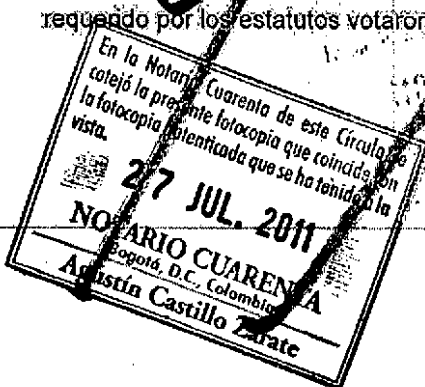
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requiendo por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

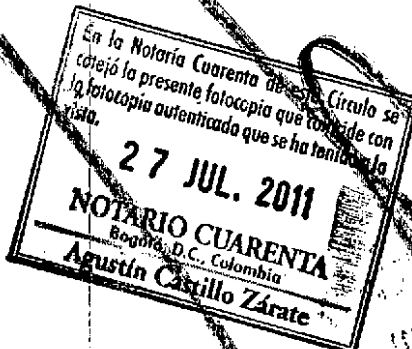
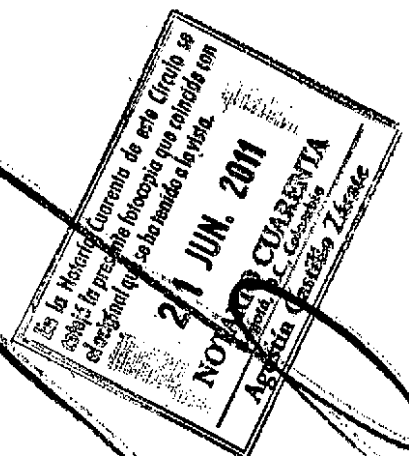
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



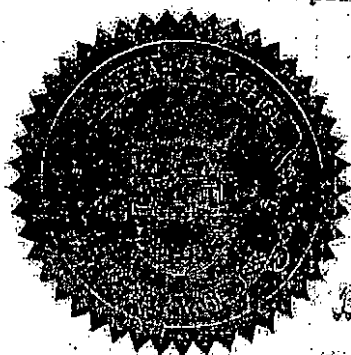
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document,
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

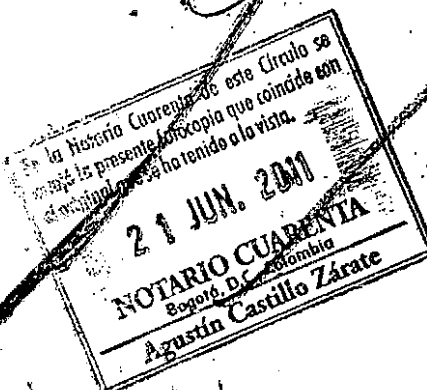
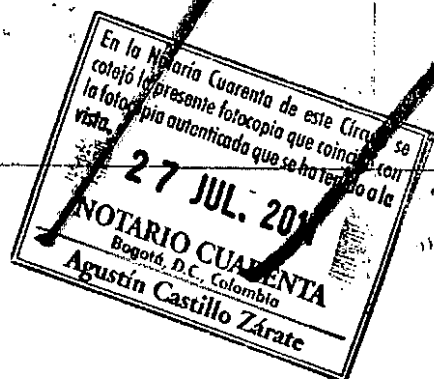
Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254033
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor

Secretary of State

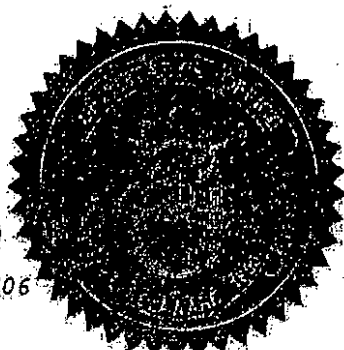


The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

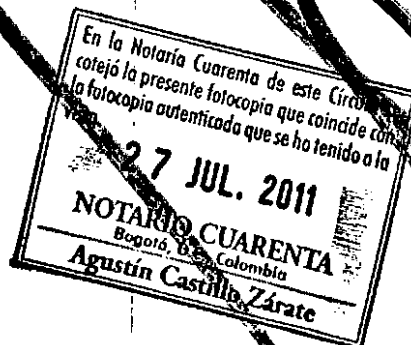
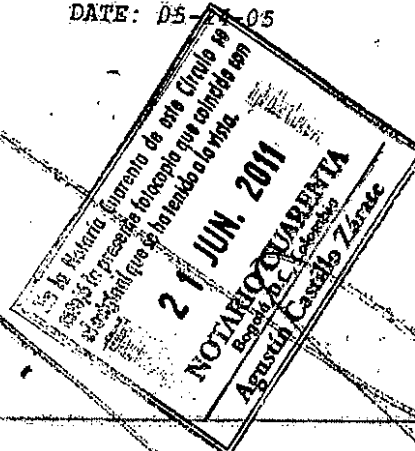
050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-17-05



State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
ISRY 040281669 - 2112549 FILE

**CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION**

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment;

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware;

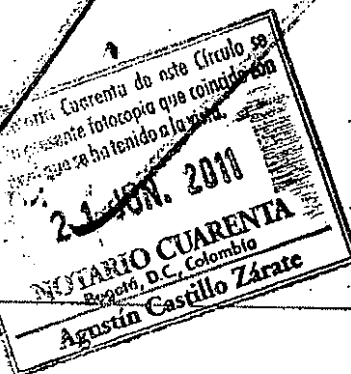
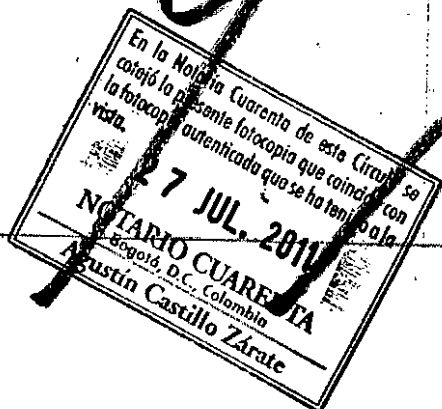
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



APOSTILLA

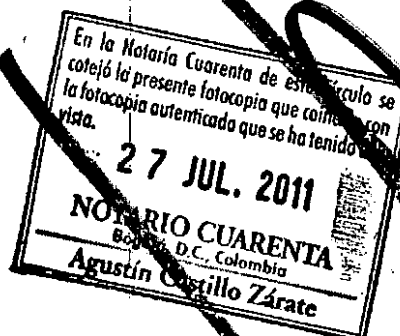
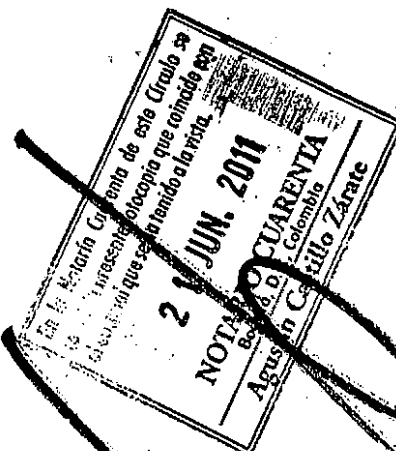
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público
3. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
4. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
5. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

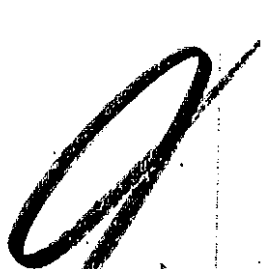
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA
DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
presentó fotocopia que coincide con
la original que se ha tenido a la vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
presentó la presente fotocopia que coincide
con la original que se ha tenido a la vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

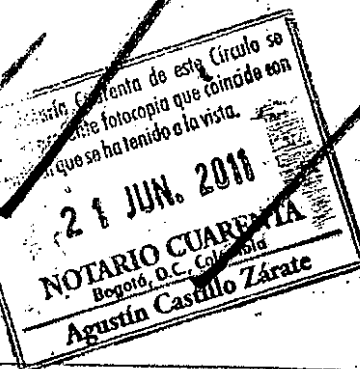
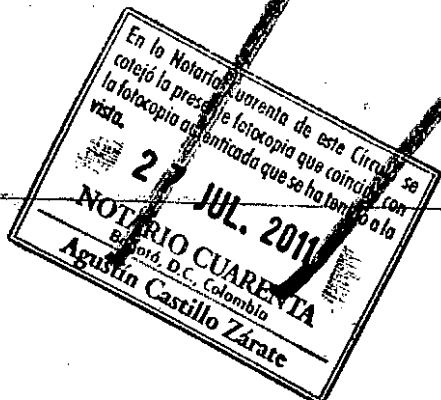
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma):

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

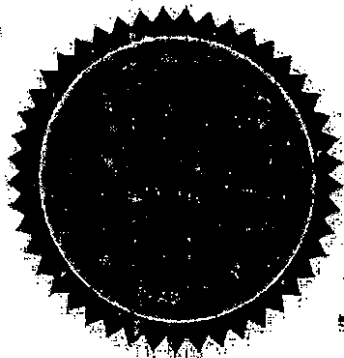
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

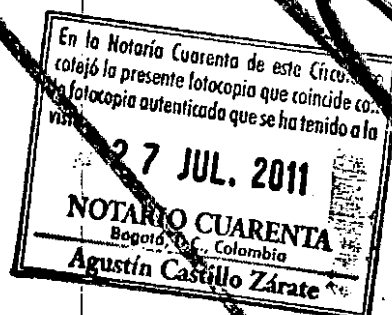
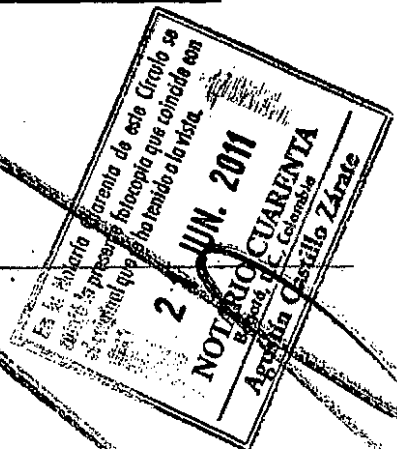
5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

050426306

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 9900386

DATE: 05-24-05



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

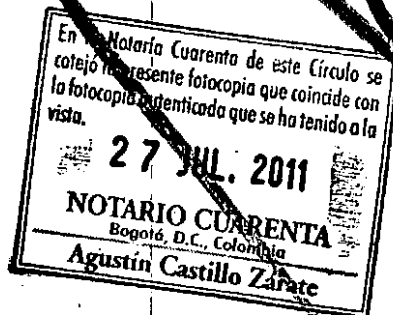
En la Notaría Cuarenta de este Circolo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la vista.
27 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE
MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Enred)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN:

FECHA:



CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital*: (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cató la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a
vista.
27 JUL. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Circuito se
cató la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a
vista.
27 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

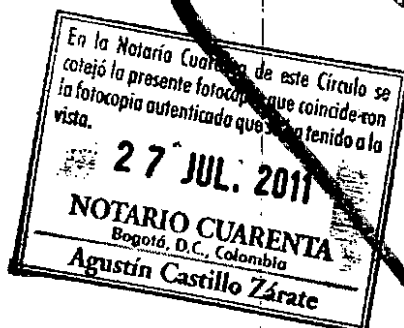
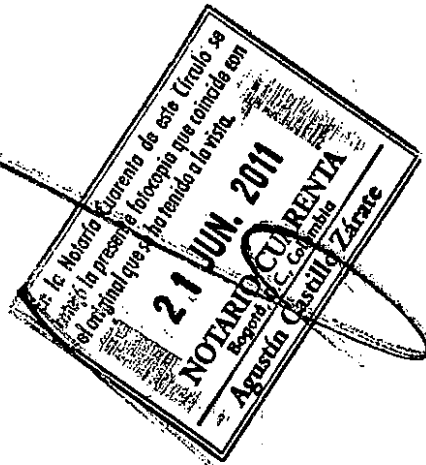
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

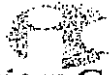
GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 325

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO

☐

Indicación que se solicita una patente

☐

Datos de identificación del solicitante

☐

Descripción de la invención☐☐Completa ☐Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-112595-00000-0000

Fecha: 2011-09-01 16:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 326

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐