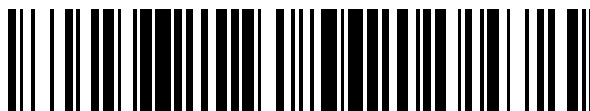


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 822**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05724048 .3**
96 Fecha de presentación: **23.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1718756**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **ENSAYO DE SELECCIÓN DE TOXINAS BOTULÍNICAS.**

30 Prioridad:
24.02.2004 US 547591 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
**ALLERGAN, INC.
2525 DUPONT DRIVE
IRVINE CA 92612, US**

72 Inventor/es:
**FERNANDEZ-SALAS, Ester;
GARY, Patton, E. y
AOKI, Kei, Roger**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

ES 2 374 822 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayo de selección de toxinas botulínicas

La presente solicitud de patente reivindica la prioridad, de acuerdo con el título 35, artículo 119(e), del Código de Estados Unidos (U.S.C.), para la solicitud provisional con el número de serie 60/547.591, presentado el 24 de febrero de 2004.

Las propiedades miorelajantes de las toxinas botulínicas (BoNT) se han explotado en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y cosméticas; véase, por ejemplo, William J. Lipham, COSMETIC AND CLINICAL APPLICATIONS OF BOTULINUM TOXIN (Slack, Inc., 2004). Por ejemplo, se han propuesto terapias con BoNT para tratar distonias: véase, por ejemplo Kei Roger Aoki y col., Method for treating Dystonia with Botulinum Toxin C to G, documento de patente de Estados Unidos N° 6.319.505 (20 de noviembre, 2001); dolor: véase, por ejemplo, Kei Roger Aoki y col., Method for Treating Pain by Peripheral Administration of a Neurotoxin, documento de patente de Estados Unidos N° 6.464.986 (15 de octubre, 2002); lesiones musculares: véase, por ejemplo, Gregory F. Brooks, Methods for Treating Muscle Injuries, documento de patente de Estados Unidos N° 6.423.319 (23 de julio, 2002); enfermedades cardiovasculares: véase, por ejemplo, Gregory F. Brooks, Methods for Treating Cardiovascular Diseases with Botulinum Toxins, publicación de patente de Estados Unidos N° 2003/0185860 (2 de octubre, 2003); trastornos neuropsiquiátricos: véase, por ejemplo, Steven Donovan, Therapeutic Treatments for Neuropsychiatric Disorders, publicación de patente de Estados Unidos N° 2003/0211121 (13 de noviembre, 2003); lumbalgia: véase, por ejemplo, Kei Roger Aoki y col., Botulinum Toxin Therapy for Lower Back Pain, publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0037852 (26 de febrero, 2004); así como otros trastornos neuromusculares: véase, por ejemplo, Kei Roger Aoki y col., Multiple Botulinum Toxins for Treating Neuromuscular Disorders and Conditions, publicación de patente de Estados Unidos N° 2001/0021695 (13 de septiembre, 2001); Kei Roger Aoki y col., Treatment of Neuromuscular Disorders and Conditions with Different Botulinum, publicación de patente de Estados Unidos N° 2002/0010138 (24 de enero, 2002); Kei Roger Aoki y col., Use of Botulinum Toxins for Treating Various Disorders and Conditions and Associated Pain, publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0013692 (22 de enero, 2004). Se han extendido otros usos propuestos de BoNT como neuromoduladores biofarmacéuticos, cubriendo una amplia variedad de tratamientos dirigidos a determinados trastornos que carecen de una base neuromuscular. Por ejemplo, los efectos sobre el sistema nervioso autónomo han permitido desarrollar la terapia con el serotipo A de la toxina botulínica (BoNT/A) para el tratamiento de hiperhidrosis o sudoración axilar, e informes indican que la BoNT/A puede ser un tratamiento eficaz para dolor y tensión miofacial, apoplejía, lesión cerebral traumática, parálisis cerebral, trastornos de motilidad gastrointestinal, incontinencia urinaria, cáncer y migrañas. Por último, se conocen ampliamente aplicaciones cosméticas o terapéuticas de otro tipo. De hecho, se prevé que el uso esperado de la BoNT tanto en tratamientos terapéuticos como cosméticos de seres humanos se extenderá a un abanico cada vez más amplio de enfermedades y alimentos que pueden beneficiarse de las propiedades miorelajantes de estas toxinas.

El uso clínico y terapéutico creciente de toxinas botulínicas precisa de la industria farmacéutica para que realice ensayos precisos de la actividad de BoNT con el fin de, por ejemplo, asegurar formulaciones farmacéuticas precisas y llevar un seguimiento de las normas de control de calidad establecidos. Además, debido al riesgo potencial asociado a cantidades pequeñas de BoNT en productos alimentarios, la industria alimenticia precisa de ensayos de actividad de BoNT, por ejemplo, para validar procedimientos de envasado de nuevos alimentos y para asegurar la inocuidad de los alimentos. Adicionalmente, los ensayos sobre la actividad de BoNT son útiles para identificar moduladores de la actividad de BoNT, por ejemplo, moduladores que reducen la actividad de BoNT que pueden ser útiles como antídotos de toxinas y moduladores que aumentan la actividad de BoNT que pueden ser útiles para crear formulaciones farmacéuticas más potentes o de mayor duración. La presente invención proporciona ensayos de BoNT novedosos para detectar la presencia de actividad de una BoNT útiles para diversas industrias, tales como, por ejemplo, la industria farmacéutica y la industria alimentaria, y también proporciona ventajas relacionadas.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1: muestra un esquema del paradigma actual del mecanismo de intoxicación con BoNT/A. Este proceso de intoxicación puede describirse como un proceso que comprende cuatro etapas: 1) unión al receptor, en la que la BoNT/A se une a un sistema receptor de BoNT/A iniciando el proceso de intoxicación; 2) internalización del complejo, en la que después de la unión de BoNT/A, se produce la endocitosis de una vesícula que contiene el complejo sistema toxina/receptor en la célula; 3) traslocación de la cadena ligera, en la que se piensa que tienen lugar múltiples eventos, incluidos cambios en el pH externo de la vesícula, formación de un poro canal que comprende el dominio H_N de la cadena pesada de BoNT/A, separación de la cadena ligera de BoNT/A de la cadena pesada, activación enzimática de la cadena ligera y liberación de la cadena ligera activada 4) modificación de la diana enzimática, en la que la cadena ligera activada de BoNT/A escinde proteolíticamente sus sustratos de SNARE diana, tales como, por ejemplo, SNAP-25.

FIG. 2: muestra un esquema de un FGFR3 y los exones empalmados alternativamente que dan como resultado FGFR3IIb y FGFR3IIc. La parte superior del diagrama muestra un dibujo generalizado de un FGFR3. El dominio extracelular comprende un péptido señalizador (cuadro etiquetado como SP), tres dominios similares a Ig (bucles etiquetados como Igl, IglI e IglII) y una caja de ácido (cuadro etiquetado como ácido). Una única región que abarca

la membrana comprende el dominio transmembrana (cuadro etiquetado como TM). La porción citoplásmica del receptor comprende el dominio tirosina quinasa. El diagrama del medio muestra un dibujo generalizado de los exones que codifican una isoforma de FGFR3IIb, en el que el exón 9 se separa del transcrito primario durante el procesamiento. El diagrama inferior muestra un dibujo generalizado de los exones que codifican una isoforma de FGFR3IIc, en el que el exón 8 se separa del transcrito primario durante el procesamiento.

FIG. 3: muestra los resultados de electroporación de PURE-A en células HIT-T15. La figura 3 muestra los resultados de un ensayo de inhibición de liberación de insulina. El gráfico indica que la adición de glucosa a una concentración 25 mM induce la secreción de insulina por parte de células no tratadas (control) y las células sometidas a electroporación sin la adición de PURE-A (electroporación No PURE-A). No obstante, las células HIT-T15 en las que se introdujo PURE-A (electroporación PURE-A) mostraron una disminución en la secreción de insulina que indicaba que estas células no eran sensibles a la inducción de secreción de insulina. La figura 3 muestra el resultado de un ensayo de escisión de SNAP-25. El análisis de inmunotransferencia (Western) identificó la presencia de un producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A en células tratadas con PURE-A (electroporación PURE-A), pero no en cada control (control y electroporación No PURE-A), con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizó con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A.

FIG. 4: muestra los efectos de electroporación de células HIT-T15 con respecto al tiempo. La figura 4a muestra los resultados de un ensayo de inhibición de liberación de insulina que demuestran que la presencia de la toxina retrasa el crecimiento de células HIT-T15 en comparación con los controles, pero las células tratadas con toxina fueron capaces de replicarse normalmente después de un periodo de recuperación. La figura 4b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que demuestra que la escisión de SNAP-25 se detectó en todos los puntos temporales analizados cuando se introdujo PURE-A en las células, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizó con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A.

FIG. 5: muestra células HIT-T15 transformadas con una biblioteca de ADNc cerebral humano y seleccionadas usando perlas magnéticas a las que se ha unido BoNT/A. Las colonias individuales son visibles en la placa y están rodeadas por perlas magnéticas.

FIG. 6: muestra los resultados de un ensayo de liberación de insulina a partir de células HIT-T15 que contenían el receptor de BoNT/A putativo. Las células se expusieron a PURE-A 1 nM y se analizaron para evaluar la inhibición de la liberación de insulina después de estimulación con glucosa.

FIG. 7: muestra el análisis de dos aislados de células HIT-T15 C6 y C7. La figura 7a muestra la reducción de la liberación de insulina en transformantes HIT-T15 representativos C6 y C7 después de la incubación con BoNT/A. La figura 7b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que demuestra que la escisión de SNAP-25 se detectó en clones C6 y C7 incubados con BoNT/A, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizó con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A.

FIG. 8: muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que identifica células con alta afinidad de captación por una toxina clostridial. La figura 8a muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) usado para identificar células capaces de captar BoNT/A. La mancha muestra cinco líneas celulares tratadas con una concentración 1 nM de PURE-A durante la noche, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizaron con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A. La figura 8b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) usado para evaluar el tiempo necesario para la captación de BoNT/A. Las manchas muestran bien células Neuro-2A o células SH-SY5Y tratadas con una concentración 1 nM de PURE-A durante varios periodos de tiempo, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizaron con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A. La figura 8c muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) usado para evaluar el intervalo de concentración necesario para la captación de BoNT/A. Las manchas muestran células Neuro-2A tratadas con un intervalo de concentraciones de PURE-A durante la noche, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizaron con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A.

FIG. 9: muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que evalúa los efectos de tratamientos con gangliósido usados para aumentar la captación de una toxina botulínica. La figura 9a muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que evalúa los efectos del tratamiento con gangliósido sobre la captación de BoNT/A. La mancha muestra células Neuro-2A tratadas sin o con 25 µg/ml de GT1b (- o +) y que se expusieron durante la noche a tres concentraciones diferentes de BoNT/A (12,5 pM, 25 pM o 50 pM), con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizó con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A. La figura 9b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que evalúan los efectos del tratamiento con gangliósidos sobre la captación de BoNT/E. La mancha muestra células Neuro-2A tratadas con, en cada caso, 25 µg/ml de GT1b, GQ1b GD1a, GD1b o GD3 y expuestas durante aproximadamente 5 horas a una concentración 14 nM de BoNT/E batenario, con cantidades iguales de proteína cargadas por cada carril y analizadas con un anticuerpo (SMI-81; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos) que detecta el sustrato de SNAP-25²⁰⁶ no escindido y el producto de escisión de SNAP-25¹⁸⁰ de BoNT/E.

FIG. 10: muestra los resultados de un experimento de reticulación en células Neuro-2A usando toxina BoNT/A-SBED. La figura 10a muestra el aislamiento de un complejo de aproximadamente 250 kDa a partir de células Neuro-2A que contienen la neurotoxina de 150 kDa reticulada con el receptor BoNT/A putativo. Las bandas se visualizaron con tinción de plata. La figura 10b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) para identificar un receptor de BoNT/A. Las manchas muestran la presencia de una banda única correspondiente a FGFR3 de 97 kDa (primer panel) y dos bandas que corresponden a la holotoxina BoNT/A de 150 kDa y la cadena pesada de BoNT/A de 100 kDa (segundo panel), con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizaron con un anticuerpo que detecta bien FGFR3 o bien BoNT/A.

FIG. 11: muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) usado para determinar la presencia de FGFR en cinco líneas celulares diferentes. Sólo los anticuerpos que se unen selectivamente a FGFR3 detectaron bandas que se correlacionaron con líneas celulares que contenían receptor de BoNT/A.

FIG. 12: muestra los resultados de un experimento de competición de receptores en células Neuro-2a usando ligandos PURE-A y FGF. Un análisis de inmunotransferencia (Western) muestra que FGF1 y FGF2 compiten eficazmente con BoNT/A por la unión al receptor de BoNT/A, con cantidades iguales de proteína cargadas por cada carril y se analizaron con un anticuerpo (SMI-81; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos) que detecta el sustrato de SNAP-25₂₀₆ no escindido y el producto de escisión de SNAP-25₁₈₀ de BoNT/E. La aparición del sustrato de SNAP-25₂₀₆ no escindido se detectó cuando había presencia de una concentración tan pequeña como 1nM de ligando FGF y era claramente visible cuando se usó había presencia de una concentración 5 nM de ligando FGF. No hubo niveles detectables del producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ de BoNT/A en tratamientos con ligando FGF a una concentración 200 mM.

FIG. 13: muestra los resultados de los estudios de fosforilación de FGFR3 en células Neuro-2A. La figura 13a muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que indica la presencia de FGFR3 fosforilado después de una exposición a FGF2 o BoNT/A. La mancha muestra células Neuro-2A tratadas bien con FGF2 5 nM o bien PURE-A 5 nM durante varios periodos de tiempo, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril y se analizaron con un anticuerpo que detecta FGFR3. La figura 13b muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que indica la reducción de FGFR3 fosforilado cuando se expone a cantidades crecientes de DMBI. La mancha muestra células Neuro-2A tratadas con FGF2 5 nM durante 10 minutos, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril y se analizaron con un anticuerpo que detecta FGFR3 fosforilado. La figura 13c muestra un análisis de inmunotransferencia (Western) que indica la reducción del producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ cuando se expone a cantidades crecientes de DMBI. Las manchas muestran en cada caso células Neuro-2A tratadas con una concentración 5 nM de PURE-A durante 10 minutos, con cantidades iguales de proteína cargadas por carril, y se analizaron con un anticuerpo que detecta el producto de escisión de SNAP-25₁₉₇ de BoNT/A.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación de un receptor de superficie celular al que se une selectivamente BoNT/A como primera etapa para la intoxicación selectiva de una neurona. La presente memoria descriptiva, en parte, divulga que el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) es útil como receptor de BoNT, tal como, por ejemplo, un receptor de BoNT/A. Además, la presente divulgación identifica gangliósidos específicos que facilitan la unión de una BoNT a un receptor de BoNT y la internalización de estas toxinas dentro de la célula neuronal, tal como, por ejemplo, una unión potenciada de BoNT/A por un receptor de BoNT/A usando un gangliósido como GT1b; y una unión potenciada de BoNT/E por un receptor de BoNT/E usando un gangliósido como GQ1b, GD1a, GD1b o GD3.

La presente invención proporciona procedimientos novedosos para detectar la presencia o ausencia de una BoNT/A activa. Los procedimientos novedosos divulgados en la presente memoria descriptiva reducen la necesidad de estudios de toxicidad basados en animales, pero sirven, no obstante, para analizar múltiples funciones de las toxinas, es decir, la unión y la captación celular de la toxina, la translocación en el citosol celular y la actividad de proteasa. Tal como se debate más adelante, los procedimientos nuevos de la presente divulgación pueden usarse para analizar muestras en bruto y heterogéneas, así como toxinas bicatenarias muy purificadas y productos de toxinas formulados y, además, son susceptibles de automatizar formatos de ensayo de alto rendimiento.

Algunos aspectos de la presente invención proporcionan procedimientos para detectar la actividad de BoNT/A poniendo en contacto una muestra con una célula que contiene un FGFR3 exógeno, en los que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectando la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula que se ha puesto en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. Otros aspectos de la presente invención proporcionan procedimientos para detectar la actividad de BoNT/A poniendo en contacto una muestra con una célula que contiene de forma transitoria un FGFR3 exógeno, en los que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectando la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula que se ha puesto en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. Otros aspectos de la presente invención proporcionan procedimientos para detectar la actividad de BoNT/A poniendo en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3

exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectando la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula que se ha puesto en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

- 5 Un aspecto de referencia proporciona procedimientos de reducción de la actividad de BoNT/A en un ser humano que comprenden administrar a dicho ser humano una composición farmacéutica que comprende una molécula que se une selectivamente a un FGFR3, en los que dicha unión selectiva reduce la capacidad de BoNT/A de unirse a dicho FGFR3.

- 10 Otro aspecto de la presente invención proporciona procedimientos para seleccionar una molécula capaz de competir con BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A poniendo en contacto dicha muestra con una composición que comprende un FGFR3 y detectando si dicha molécula se une selectivamente a dicho FGFR3, en los que la unión selectiva de dicha molécula a dicho FGFR3 indica que dicha molécula es capaz de competir con BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A y en los que si dicha molécula es BoNT/A, dichos procedimientos no comprenden un ensayo de DL₅₀.

- 15 Un aspecto de referencia proporciona procedimientos de comercialización de una neurotoxina capaz de unirse selectivamente al mismo FGFR3 que BoNT/A que comprenden obtener la aprobación de comercialización de una autoridad reguladora gubernamental o regional para una neurotoxina terapéutica, en los que dicha neurotoxina se analiza para evaluar su unión selectiva a una célula que comprende poner en contacto dicha neurotoxina con una composición que comprende un FGFR3 y detectar si dicha neurotoxina se une selectivamente a dicho FGFR3, en los que la unión selectiva de dicha neurotoxina a dicho FGFR3 indica que dicha neurotoxina es capaz de unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A y en los que si dicha molécula es BoNT/A, dichos procedimientos no comprenden un ensayo de DL₅₀; envasar dicha neurotoxina para su venta de un modo consecuente con los requerimientos de dicha autoridad reguladora y vender dicha neurotoxina.

- 25 Un aspecto de referencia proporciona procedimientos de comercialización de una neurotoxina capaz de unirse selectivamente al mismo FGFR3 que BoNT/A que comprenden obtener la aprobación de comercialización de una autoridad reguladora gubernamental o regional para una neurotoxina terapéutica, en los que dicha neurotoxina se analiza para evaluar su unión selectiva a una célula que comprende poner en contacto dicha neurotoxina con una célula que contiene un FGFR3 exógeno en los que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con relación a una célula control, siendo indicativo de la actividad de BoNT/A una diferencia en la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control; envasar dicha neurotoxina para su venta de un modo consecuente con los requerimientos de dicha autoridad reguladora y vender dicha neurotoxina.

- 35 Las BoNT se traducen cada una como un polipéptido monocatenario de aproximadamente 150 kDa que subsiguientemente se escinde mediante escisión proteolítica dentro de un bucle disulfuro por proteasas bacterianas o hísticas. Este procesamiento postraducciona proporciona una molécula bicatenaria que comprende una cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y una cadena pesada (HC) de aproximadamente 100 kDa que están unidas mediante un enlace disulfuro sencillo e interacciones no covalentes. Cada una de las moléculas bicatenarias maduras comprende tres dominios de distinta funcionalidad: 1) un dominio enzimático localizado en la LC que incluye una región de metaloproteasa que contiene una actividad de endopeptidasa dependiente de cinc que está dirigida específicamente a los componentes del núcleo del aparato de liberación de neurotransmisores; 2) un dominio de translocación incluido dentro de la mitad amino-terminal de la HC (H_N) que facilita la liberación de la toxina desde las vesículas intracelulares al citoplasma de la célula diana; y 3) un dominio de unión que se encuentra en la mitad carboxi-terminal de la HC (H_C) que determina la actividad de unión y la especificidad de unión de la toxina al complejo receptor localizado en la superficie de la célula diana.

- 45 Tanto la unión, como la translocación y la actividad enzimática de estos tres dominios funcionales son necesarias para la toxicidad. Aunque todos los detalles de este proceso no son aún conocidos con precisión, el mecanismo de intoxicación celular general por el que las BoNT se introducen en una neurona e inhiben la liberación de neurotransmisores es similar, independientemente del tipo. Aunque los solicitantes no desean estar limitados por la descripción siguiente, el mecanismo de intoxicación puede describirse como un mecanismo de cuatro etapas: 1) unión al receptor, 2) internalización del complejo 3) translocación de la cadena ligera y 4) modificación de la diana enzimática (véase la figura 1). El proceso se inicia cuando el dominio H_C de una BoNT de une a un complejo receptor específico de BoNT localizado en la superficie de la membrana plasmática de una célula diana. Se piensa que la especificidad de unión de un complejo receptor se logra, en parte, mediante combinaciones específicas de gangliósidos y receptores proteicos que parece que comprenden de forma diferente cada complejo receptor de BoNT/A. Una vez unido, los complejos BoNT/receptor se internalizan mediante endocitosis y las vesículas internalizadas se clasifican para rutas intracelulares específicas. La etapa de translocación parece que se desencadena mediante la acidificación del compartimiento de la vesícula. Este proceso parece que inicia dos reordenamientos estructurales dependientes del pH importantes que aumentan la hidrofobicidad y promueven la actividad enzimática de la toxina. Una vez activada, la endopeptidasa de cadena ligera de la toxina se libera desde la vesícula intracelular al citosol, en el que se dirige específicamente a de uno a tres componentes del núcleo conocidos del aparato de liberación de neurotransmisores. Tres de estas proteínas del núcleo, la proteína de

membrana asociada a la vesícula (VAMP)/sinaptobrevina, la proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y la sintaxina, son necesarias para el anclaje a la vesícula sináptica y la fusión en el nervio terminal y constituyen miembros de la familia del receptor de proteína de unión del factor sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE). La proteólisis selectiva de SNARE sinápticas tiene importancia en el bloqueo total de liberación de neurotransmisores provocado por toxinas clostridiales *in vivo*. Las dianas de proteínas SNARE de toxinas clostridiales son comunes a la exocitosis en una variedad de tipos no neuronales, en estas células, así como neuronas, la actividad de la peptidasa de cadena ligera inhibe la exocitosis, véase, por ejemplo, Yann Humeau y col., How Botulinum and Tetanus Neurotoxins Block Neurotransmitter Release, 82(5) Biochimie. 427-446 (2000); Kathryn Turton y col., Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Structure, Function and Therapeutic Utility, 27(11) Trends Biochem. Sci. 552-558. (2002); M. Zouhair Atassi, Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins, (Dirk W. Dressler y Joseph J. Jankovic ed., 2003); Giovanna Lalli y col., The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons, 11(9) Trends Microbiol. 431-437, (2003).

Las estructuras cristalinas tridimensionales de BoNT/A indican que los tres dominios funcionales de la toxina son estructuralmente distintos; véase, por ejemplo, Humeau y col., supra, (2000), Turton y col., supra, (2002) y Lalli y col., supra, (2003). El motivo de consenso HEXXH de la cadena ligera forma el bolsillo de unión al cinc tetraédrico del sitio catalítico localizado en una hendidura profunda de la superficie de la proteína que es accesible por un canal. A este motivo de unión a cinc conservado se une al menos un átomo de cinc necesario para su función catalítica. La estructura de los dominios H_N y H_C consta principalmente de topologías de lámina β que están unidas por una hélice α única. El dominio H_N comprende un plegamiento de rollo de gelatina de barrera β , que semeja el resto de unión a carbohidrato que se encuentra en lectinas, sugiriendo que este dominio puede reconocer moléculas que contienen oligosacáridos y tener un papel en el ordenamiento intracelular. Además de su similaridad estructural general con lectinas, el dominio H_N también contiene dos características estructurales distintas que sugieren funciones. Primeramente, el dominio H_N contiene un par de hélices anfifáticas largas que semejan el motivo de hélice superenrollada que se encuentra en algunas proteínas víricas. En virus, estas hélices favorecen la fusión de la membrana vírica a la membrana celular del huésped, sugiriendo que la región de hélice superenrollada puede favorecer la inserción del dominio H_N en la membrana de una vesícula intracelular. En segundo lugar, un bucle largo denominado "cinturón de translocación" envuelve una hendidura cargada negativamente grande de la cadena ligera que bloquea el acceso del átomo de cinc al bolsillo de unión catalítica del sitio activo. El dominio H_C contiene un sitio de unión a gangliósido y un motivo de cinco restos de unión a gangliósido. Estas regiones adoptan una estructura de plegamiento de tres hojas en β modificada que forma cuatro regiones de unión a carbohidrato distintas que se cree que median en la unión a moléculasceptoras específicas que contienen carbohidrato de la superficie celular. De acuerdo con esta función, el dominio H_C muestra la mayor divergencia de secuencia entre toxinas clostridiales que puede considerarse para las distintas propiedades de unión y esquemas de selección de TeNT y BoNT. El dominio H_C se inclina lejos del dominio H_N exponiendo los bucles de superficie y haciéndolos accesibles para la unión. Parece que no tiene lugar ningún contacto entre la cadena ligera y el dominio H_C. El extremo N de la región H_C presenta una arquitectura de rollo de gelatina relacionada con la de las eslectinas, una familia de proteínas de unión a carbohidrato. Por el contrario, el extremo C de H_C está en una conformación de tres hojas pseudo-triple que presenta similaridad estructural con las interleucinas-1 β y 1 α no relacionadas secuncialmente, inhibidores de tripsina de tipo Kunitz, así como con los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estas proteínas, en su mayor parte proteínas β están implicadas en interacciones proteína-proteína.

Parece que los gangliósidos de la superficie celular son parte del sistema receptor para la BoNT/A y parece que participan en la unión de la toxina a su receptor de la BoNT/A. Aunque la unión de toxinas no es estrictamente dependiente de la presencia de gangliósidos, la presencia de gangliósidos específicos parece necesaria para una unión de alta afinidad. En particular, se ha observado que los BoNT interactúan *in vitro* e *in vivo* con polisialogangliósidos, especialmente los de la serie G1b (GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b), véase, por ejemplo, Jane L. Halpern y Elaine A. Neale, Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport, 195 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 221-241 (1995). La preincubación de la toxina con estos gangliósidos protege la unión neuromuscular (NMJ) de ratones de la toxicidad producida por BoNT. Los sitios de unión a BoNT de alta afinidad sensibles a tripsina se encontraron en sinaptosomas aislados, véase, por ejemplo R. S. Williams y col., Radioiodination of botulinum neurotoxin type A with retention of biological activity and its binding to brain synaptosomes. 131(2) Eur. J. Biochem. 1437-1445 (1983). Debido a que las lectinas con alta afinidad por el ácido siálico antagonizan la unión de BoNT, sus receptores proteicos pueden ser glucoproteínas. Los receptores para BoNT los dirigirían a vesículas ácidas que permiten la translocación de la LC en el citosol de la neurona. La secuencia de aminoácidos en el extremo C de H_C está poco conservada entre diferentes neurotoxinas clostridiales y experimentos de competición han demostrado que serotipos de BoNT diferentes se unen a receptores proteicos diferentes en la superficie de células neuronales. Por lo tanto, este análisis es consecuente con la hipótesis de que las neurotoxinas BoNT se unen a sistemas receptores que comprenden al menos dos componentes; un componente proteico y un componente carbohidrato.

Sobre la base de estos hallazgos y tal como da a conocer la presente divulgación, los solicitantes han descubierto que células que expresan el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) pueden unirse a BoNT/A. La internalización de la toxina puede seguirse cuando las líneas celulares están expuestas a la toxina. Además, la internalización de BoNT/A se inhibe de un modo dependiente de la dosis cuando se añade a concentraciones

crecientes FGF, tal como, por ejemplo FGF1, FGF2, FGF4, FGF8 y FGF9. Las células analizadas por los solicitantes que no mostraron el receptor de FGFR3 fueron incapaces de internalizar la toxina, aunque cuando se sometieron a electroporación en presencia de BoNT/A, la escisión intracelular de SNAP-25 podía detectarse, indicando que la actividad de endopeptidas de la toxina permanecía intacta, y que las células seguían siendo susceptibles a la endopeptidasa. Además, los aplicantes han hallado que el pretratamiento con el polisialogangliósido GT1b aumenta la captación celular de BoNT/A.

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) participan en muchos procesos de desarrollo, diferenciación y crecimiento y de reparación de células mediante las rutas de señalización combinatorias complejas. Actualmente, al menos se conocen 23 ligandos (FGF1-23) para señalizar a través de una familia de cinco receptores FGF de tirosina quinasa transmembranales (FGFR1-4). La identidad de secuencia de aminoácidos está muy conservada entre miembros de la familia FGFR y cada uno comparte una organización estructural característica. La porción extracelular de FGFR comprende un péptido señalizador hidrófobo amino-terminal, tres dominios similares a Ig (IgI, IgII y IgIII) y un dominio de caja de ácido de aproximadamente ocho restos ácidos, seguidos de un dominio hidrófobo transmembrana único que, a su vez, está seguido de un dominio tirosina quinasa intracelular (véase la figura 2). La afinidad de FGFR por sus ligandos es muy diversa con distintas afinidades por cada miembro de la familia de factores de crecimiento; véase, por ejemplo, C. J. Powers y col., Fibroblast growth factors, their receptors and signaling 7(3)Endocr. Relat. Cancer. 165-197 (2000). La tabla 1 enumera algunas relaciones de señalización FGF-FGFR conocidas de diversos FGF y sus FGFR.

TABLA 1. Variantes de FGFR								
Variantes	FGFR1		FGFR2		FGFR3		FGFR4	FGFR4
	IIIb	IIIc	IIIb	IIIc	IIIb	IIIc		
Ligandos	FGF-1 FGF-2 FGF-3 FGF-4 FGF-8 FGF-10 FGF-8 FGF-17	FGF-1 FGF-2 FGF-4 FGF-5 FGF-6 FGF-6 FGF-8 FGF-9	FGF-1 FGF-3 FGF-7 FGF-10	FGF-1 FGF-2 FGF-4 FGF-5 FGF-6 FGF-8 FGF-9 FGF-17	FGF-1 FGF-9 FGF-2 FGF-4 FGF-8 FGF-9		FGF-1 FGF-2 FGF-4 FGF-6 FGF-8 FGF-9	FGF-1 FGF-2
Tejidos	Cerebro, hueso, riñón, piel, pulmón, corazón, músculo, neurona		Cerebro, riñón, piel, pulmón, hígado, células gliales		Cerebro, SNC, riñón, piel, pulmón, testículo		Pulmón, hígado, riñón	Cerebro, piel, pulmón, testículo

Tabla 1- Variantes de FGFR y afinidades de ligandos. Variantes de FGFR, ligandos asociados y distribución en tejidos, véase, por ejemplo, Powers y col., anteriormente, (2000) y Reuss y von Bohlen und Halbach, anteriormente, (2003).

La diversidad en la señalización de FGF más allá de los cinco receptores se logra en parte por la generación de variantes de ajuste alternativas que codifican distintas isoformas de receptores; véase, por ejemplo, Bernhard Reuss y Oliver von Bohlen und Halbach, Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system, 313(2) Cell Tissue Res. 139-157 (2003). La región proteica que parece que tiene la mayor influencia sobre la especificidad de unión a ligandos es una porción del dominio IgIII, para el que se han identificado las isoformas codificadas por tres variantes de ajuste diferentes. Estas tres isoformas, denominadas IgIIIa, IgIIIb e IgIIIc, tienen afinidades de unión relativas por miembros diferentes de la familia FGFR. El ajuste alternativo en el dominio de unión a ligando FGFR, denominado a y b, genera isoformas de receptor adicionales con afinidades por ligandos nuevos. Las isoformas para IgIIIa, IgIIIb e IgIIIc se han identificado tanto para FGFR1 como para FGFR2. Hasta ahora no se ha informado de la isoforma IgIIIa de FGFR3 ni de las isoformas IgIIIa e IgIIIb de FGFR4 y FGFR5.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el FGFR3 existe comúnmente en dos isoformas, FGFR3IIIc y FGFR3IIIb, que surgen siguiendo el ajuste alternativo del transcrito principal en el que se omite bien el exón 8 o bien el exón 9, respectivamente (véase la figura 2). No obstante, existen isoformas adicionales. Por ejemplo, se ha descrito una isoforma de FGFR3 que carece de caja ácida; véase, por ejemplo, Akio Shimizu y col., A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells, 276(14) J. Biol. Chem. 11031-11040 (2001). En otro ejemplo, se identificó recientemente una isoforma nueva potencialmente citoplásmica, denominada FGFR3S, en la que los exones 8, 9 y 10 están desempalmados creando un FGFR3 que carece de la segunda mitad de IgIIIc y del dominio transmembrana; véase, por ejemplo, L-M. Sturla y col., FGFR3IIIS: a novel soluble FGFR3 spliced variant that modulates growth is frequently expressed in tumour cells, 89(7) Br. J. Cancer 1276-1284 (2003).

Algunos aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A poniendo en contacto una muestra con una célula que contiene un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectando la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En una realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otra realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

Tal como se usa en el presente documento "serotipo A de toxina botulínica" es sinónimo de "BoNT/A," "tipo A," o terminología similar que se refiera de forma no ambigua a la neurotoxina Clostridium botulinum de tipo A, significa cualquiera de entre una serie de neurotoxinas polipeptídicas y derivados de las mismas que pueden purificarse a partir de cepas de serotipo A de Clostridium botulinum y que comparten FGFR3 como receptor de superficie celular. Dichas neurotoxinas incluyen las que se encuentran en, o que se corresponden con las cepas y números de acceso enumerados en, la tabla 2.

TABLA 2	
Cepa	Nº de acceso
CL138	AAQ16535
137	AAQ16534
129	AAQ16533
13	AAQ16532
42N	AAQ16531
Hall A-hyper	AAM75961
667Ab	CAA61124
NCTC 2916	CAA36289
Allergan-Hall A	AAQ06331
62A	AAA23262
Kyoto-F	CAA51824
NIH NCTC 7272 7103-H tipo A	BAA11051
Kumgo	AAO21363

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3" es sinónimo de "FGFR3" y significa un péptido, o peptidomimético de, FGFR3 que se une a BoNT/A de un modo tal que facilite una respuesta por intoxicación con BoNT/A. Los FGFR3 útiles en la presente invención abarcan, sin suponer limitación, FGFR3 natural, variantes de FGFR3 de origen natural, variantes de FGFR3 no naturales, tales como, por ejemplo, variantes producidas por ingeniería genética mediante mutagénesis aleatoria o diseño racional, y fragmentos activos derivados de FGFR3. Como ejemplo no limitantes, un FGFR3 humano, variantes de FGFR3 humano de origen natural, variantes de FGFR3 humano no naturales y fragmentos de FGFR3 humano que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 bovino, variantes de FGFR3 bovino de origen natural, variantes de FGFR3 bovino no naturales y fragmentos de FGFR3 bovino que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 de rata, variantes de FGFR3 de rata de origen natural, variantes de FGFR3 de rata no naturales y fragmentos de

FGFR3 de rata que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante más, un FGFR3 de ratón, variantes de FGFR3 de ratón de origen natural, variantes de FGFR3 de ratón no naturales y fragmentos de FGFR3 de ratón que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 de pollo, variantes de FGFR3 de pollo de origen natural, variantes de FGFR3 de pollo no naturales y fragmentos de FGFR3 de pollo que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 de rana, variantes de FGFR3 de rana de origen natural, variantes de FGFR3 de rana no naturales y fragmentos de FGFR3 de rana que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 de tritón, variantes de FGFR3 de tritón de origen natural, variantes de FGFR3 de tritón no naturales y fragmentos de FGFR3 de tritón que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. En otro ejemplo no limitante, un FGFR3 de pez cebra, variantes de FGFR3 de pez cebra de origen natural, variantes de FGFR3 de pez cebra no naturales y fragmentos de FGFR3 de pez cebra que mantienen la capacidad de unirse selectivamente a BoNT/A y median el proceso de intoxicación, pueden ser útiles como receptores de BoNT/A en aspectos de la presente invención. Se entiende también que ambas moléculas de ácido nucleico, ADN y ARN, que codifican un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva y moléculas peptídicas o peptidomiméticos que comprenden un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva son útiles en aspectos de la presente invención. SEC ID N.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27 divulgan moléculas de ácido nucleico que codifican representantes de FGFR3 útiles en aspectos de la presente invención, mientras que SEC ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 divulgan moléculas peptídicas representantes de FGFR3 útiles en aspectos de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" se usa de forma amplia para referirse a moléculas similares a péptidos que se unen selectivamente a BoNT/A como el receptor de BoNT/A peptídico sobre el que se basan estructuralmente. Dichos peptidomiméticos incluyen péptidos químicamente modificados, moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos de origen no natural y peptoides, que son moléculas similares a péptidos que son el resultado del ensamble oligomérico de glicinas N-sustituidas, y que se unen selectivamente a BoNT/A como el sustrato peptídico del que derivan los peptidomiméticos; véase, por ejemplo, Goodman y Ro, *Peptidomimetics for Drug Design*, en *"Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery"* Vol. 1 (ed. M.E. Wolff; John Wiley y Sons, 1995), páginas 803-861).

Se conocen en la técnica una variedad de peptidomiméticos, incluidos, por ejemplo, moléculas similares a péptidos que contienen un aminoácido constreñido, un componente no peptídico que imita la estructura secundaria peptídica o un isómero de enlace amida. Un peptidomimético que contiene un aminoácido de origen no natural constreñido puede incluir, por ejemplo, un aminoácido α -metilado; una α,α -dialquil-glicina o ácido α -aminocicloalcano carboxílico; un aminoácido N^α - C^α ciclado; un aminoácido N^α -metilado; un ácido G o α -amino cicloalcano carboxílico; un aminoácido α,α -insaturado; un α,α -dimetil o α -metil aminoácido; un 2,3-metano aminoácido G-sustituido; un aminoácido NC^α o C^α - C^α ciclado; o una prolina sustituida u otro mimético de aminoácido. Además, un peptidomimético que imita la estructura secundaria peptídica puede contener, por ejemplo, un imitador del giro α no peptídico; imitador de giro α ; imitador de la estructura de lámina α ; o imitador de la estructura helicoidal, cada uno de los cuales es bien conocido en la técnica. Un péptidomimético también puede ser una molécula similar a péptido que contiene, por ejemplo, un isómero de enlace amida tal como una modificación retro-inversa; enlace amida reducido; enlaces metilensulfóxido o metilensulfóxido; enlace metilenoéter; enlace etileno; enlace tioamida; enlace trans-olefínico o fluoroolefínico; anillo de tetrazol 1,5-disustituido; enlace cetometileno o fluorocetometileno u otro isómero de amida. Un experto en la técnica entiende que estos y otros peptidomiméticos están incluidos dentro del significado del término "peptidomimético" tal como se usa en el presente documento.

De este modo, en algunos aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3IIIb humano que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 2. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3IIIb humano que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N.º: 2.

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3IIIc humano que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 4, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 4, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 4, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 4, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N.º: 4 o al menos el 95 % de

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de pollo que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 20. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3 de pollo que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N°: 20.

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3-1 de rana que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 22. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3 de rana que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N°: 22.

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3-2 de rana que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 24. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3 de rana que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N°: 24.

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de tritón que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 26. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3 de tritón que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N°: 26.

En otros aspectos de la presente invención, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de pez cebra que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, al menos el 70 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28, al menos el 75 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28, al menos el 80 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28, al menos el 85 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28, al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28 o al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con el FGFR3 de SEC ID N°: 28. En otros aspectos de la presente realización, el FGFR3 es un FGFR3 de pez cebra que se une selectivamente a BoNT/A que tiene, por ejemplo, como máximo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos con relación al FGFR3 de SEC ID N°: 28.

Otros aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, el uso opcional de polisialogangliósidos, especialmente los de la serie G1b, tales como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b. Las composiciones celulares que comprenden un FGFR3 y un polisialogangliósido pueden aumentar la unión selectiva a BoNT/A con relación a una composición que no contiene un polisialogangliósido. De este modo, en una realización, una composición comprende un FGFR3 y opcionalmente un polisialogangliósido. En algunos aspectos de la presente realización, una composición comprende un FGFR3 y opcionalmente un polisialogangliósido G1b tal como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b.

De este modo, en una realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene un FGFR3 exógeno y opcionalmente un polisialogangliósido G1b, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otra realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno y un polisialogangliósido G1b, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto,

siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

Otros aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A que comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que contiene transitoriamente" significa un FGFR3 que se introduce temporalmente en una célula con el fin de realizar los ensayos divulgados en la presente memoria descriptiva. De este modo, los aspectos de una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 divulgados en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula que contiene un FGFR3 durante, por ejemplo, como máximo aproximadamente cinco días y, como máximo, aproximadamente seis días, como máximo aproximadamente siete días, como máximo aproximadamente ocho días, como máximo aproximadamente nueve días y, como máximo, aproximadamente diez días.

En un aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico de un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de mamífero, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de ave, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de anfibio, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de pez, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

En otro aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. De este modo, en una realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno de mamífero, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno de ave, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno de anfibio, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la

presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene transitoriamente un FGFR3 exógeno de pez, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

Otros aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A que comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que contiene de forma estable" significa un FGFR3 que se introduce en una célula y se mantiene durante periodos largos con el fin de realizar los ensayos de la presente memoria descriptiva. Las moléculas de ácido nucleico mantenidas de forma estable abarcan moléculas de ácido nucleico mantenidas de forma estable que son extracromosómicas y se replican de forma autónoma y moléculas de ácido nucleico mantenidas de forma estable que están integradas en el material cromosómico de la célula y se replican de forma no autónoma. De este modo, aspectos de una célula que contiene de forma estable un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula que contiene un FGFR3 durante, por ejemplo, al menos diez días, al menos 20 días, al menos 30 días, al menos cuarenta días, al menos 50 días y al menos 60 días, al menos 70 días, al menos 80 días, al menos 90 días y al menos cien días. Otros aspectos de una célula que contiene de forma estable un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula que contiene un FGFR3 durante, por ejemplo, al menos 100 días, al menos 200 días, al menos 300 días, al menos 400 días y al menos 500 días. Otros aspectos más de una célula que contiene de forma estable un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula que contiene un FGFR3 de forma permanente.

En un aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico de un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de pájaro tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de mamífero, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de ave, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de anfibio, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento de detección de la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 exógeno de pez, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

En otro aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno de mamífero, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno de ave, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A,

y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En un aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno de anfibio, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A. En otro aspecto de la presente realización, un procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A comprende poner en contacto una muestra con una célula que contiene de forma estable un FGFR3 exógeno de pez, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.

Tal como se ha mencionado anteriormente, una molécula de ácido nucleico puede usarse para expresar un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva. Se considera que puede usarse cualquier procedimiento para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula. Los procedimientos útiles para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula incluyen, sin suponer limitación, procedimientos mediados por fosfato de calcio, DEAD, procedimientos mediados por dextrano, mediados por lípidos, mediados por polibreno, mediados por polilisina, mediados víricamente, microinyección, fusión de protoplastos, biolísticos, electroporación y conjugación a un anticuerpo, gramacidina S, desarrollo vírico artificial u otros vehículos intracelulares tales como TAT; véase, por ejemplo, *Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells*, páginas 16.1-16.62 (Sambrook y Russell, ed., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Alessia Colosimo y col., *Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells*, 29(2) *Biotechniques* 314-318, 320-322, 324 (2000); Philip Washbourne y A. Kimberley McAllister, *Techniques for gene transfer into neurons*, 12(5) *Curr. Opin. Neurobiol.* 566-573 (2002); y *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, páginas 9.16.4-9.16.11 (2000). Un experto en la técnica entiende que la selección de un procedimiento específico para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula dependerá, en parte, de si la célula contendrá transitoriamente un receptor de BoNT/A o si la célula contendrá de forma estable un receptor de BoNT/A.

Tal como se ha mencionado anteriormente, un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva puede introducirse en una célula. Se considera que puede usarse cualquier procedimiento que use un agente de liberación para introducir un FGFR3 en una célula. Tal como usa en el presente documento, "agente de liberación" significa cualquier molécula que permita o potencie la internalización de un FGFR3 unido covalentemente, unido de forma no covalente o de asociado de cualquier otro modo a la célula. De este modo, la expresión "agente de liberación" abarca, sin suponer limitación, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, moléculas de ácido nucleico, liposomas, lípidos, virus, retrovirus y células que, sin suponer limitación, transportan un sustrato unido covalentemente o de forma no covalente a la membrana celular, al citoplasma celular o al núcleo. Se entiende, además, que la expresión "agente de liberación" abarca moléculas que se internalizan mediante cualquier mecanismo, incluidos agentes de liberación que actúan mediante endocitosis mediada por receptor y los que son independientes de endocitosis mediada por receptor.

Un agente de liberación útil en la invención también puede ser un agente que permita o potencie la captación celular de un FGFR3 unido covalentemente tal como, por ejemplo, proteínas de fusión producidas mediante conjugación química o genéticamente. En Steven F. Dowdy, *Protein Transduction System and Methods of Use Thereof*, Publicación de patente internacional N° WO 00/34308 (15 de junio, 2000); Gérard Chassaing y Alain Prochiantz, *Peptides which can be Used as Vectors for the Intracellular Addressing of Active Molecules*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.080.724 (27 de junio, 2000); Alan Frankel y col., *Fusion Protein Comprising TAT-derived Transport Moiety*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.674.980 (7 de octubre, 1995); Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptide Conjugates*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.747.641 (5 de mayo, 1998); Alan Frankel y col., *TAT-derived Transport Polypeptides and Fusion Proteins*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.804.604 (8 de septiembre, 1998); Peter F. J. O'Hare y col., *Use of Transport Proteins*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.734.167 (11 de mayo, 2004); Yao-Zhong Lin y Jack J. Hawiger, *Method for importing biologically active molecules into cells*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.807.746 (15 de septiembre, 1998); Yao-Zhong Lin y Jack J. Hawiger, *Method for importing biologically active molecules into cells*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.043.339 (28 de marzo, 2000); Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.248.558 (19 de junio, 2001); Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.432.680 (13 de agosto, 2002); Jack J. Hawiger y col., *Method for importing biologically active molecules into cells*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.495.518 (17 de diciembre, 2002); Yao-Zhong Lin y col., *Sequence and Method for Genetic Engineering of Proteins with Cell Membrane Translocating Activity*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.780.843 (24 de agosto, 2004); Jonathan B. Rothbard y Paul A. Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.306.993 (23 de octubre, 2001); Jonathan B. Rothbard y Paul A. Wender, *Method and Composition for Enhancing Transport Across Biological Membranes*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.495.663 (17 de diciembre, 2002) y Pamela B. Davis y col., *Fusion proteins for protein delivery*, documento de patente de Estados Unidos N°

6.287.817 (11 de septiembre, 2001) se describen, por ejemplo, procedimientos de agents de liberación de unión covalente y procedimientos para usar dichos agentes.

Un agente de liberación útil en la invención también puede ser un agente que permita o potencie la captación celular de un FGFR3 asociado de forma no covalente. En Gilles Divita y col., *Peptide-mediated Transfection Agents and Methods of Use*, documento de patente de Estados Unidos N° 6.841.535 (11 de enero, 2005); Philip L. Felgner y Olivier Zelphati, *Intracellular Protein Delivery Compositions and Methods of Use*, documento de patente de Estados Unidos N° 2003/0008813 y Michael Karas *Intracellular Delivery of Small Molecules, Proteins and Nucleic Acids*, documento de patente de Estados Unidos N° 2004/0209797 (21 de octubre, 2004) se describen, por ejemplo, procedimientos que operan en ausencia de unión covalente y procedimientos para usar dichos agentes. Dichos agentes de liberación peptídicos pueden prepararse y usarse mediante procedimientos estándar y están disponibles en el mercado; véase, por ejemplo, el reactivo Chariot™ (Active Motif, Carlsbad, CA, Estados Unidos); reactivo BioPORTER® (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), reactivo de suministro de proteínas BioTrek™ (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) y reactivo de transfección de proteínas Pro-Ject™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, Estados Unidos).

Tal como se ha mencionado anteriormente, una célula puede contener de forma estable un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva. En, por ejemplo, Elizabeth E. Plowright y col., *Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis*, 95(3) *Blood* 992-998 (2000); TC; véase, por ejemplo, Hiroyuki Onose y col., *Over-expression of fibroblast growth factor receptor 3 in a human thyroid carcinoma cell line results in overgrowth of the confluent cultures*, 140(2) *Eur. J. Endocrinol.* 169-173 (1999); M. Kana y col., *Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein*, 272(10) *J. Biol. Chem.* 6621-6628 (1997) y Janet E. Henderson y col., *Expression of FGFR3 with the G380R achondroplasia mutation inhibits proliferation and maturation of CFK2 chondrocytic cells*, 15(1) *J. Bone Miner. Res.* 155-165 (2000) se describen procedimientos útiles para producir y usar células que contienen de forma estable un FGFR3.

Otro aspecto de la presente invención proporciona, en parte, un constructo de expresión que permite la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva. Estos constructos de expresión comprenden un marco de lectura abierto que codifica un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva, unido operativamente a secuencias control de un vector de expresión útil para la expresión de FGFR3 en una célula. La expresión "unido operativamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera entre una variedad de procedimientos de clonación que pueden ligar una molécula de ácido nucleico divulgada en la presente memoria descriptiva en un vector de expresión de tal modo que se exprese un péptido codificado por la composición cuando se introduzca en una célula. Las técnicas de biología molecular bien establecidas que pueden ser necesarias para fabricar un constructo de expresión divulgado en la presente memoria descriptiva incluyen, pero no están limitadas a, procedimientos que implican la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacciones enzimáticas de restricción de la amplificación, electroforesis en gel de agarosa, ligación de ácidos nucleicos, transformación bacteriana, purificación de ácidos nucleicos, secuenciación de ácidos nucleicos, son procedimientos rutinarios que están dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documento. En, por ejemplo, *MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL*, anteriormente, (2001) y *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Frederick M. Ausubel y col., ed. John Wiley e hijos, 2004) se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para fabricar un constructo de expresión. Estos protocolos son procedimientos rutinarios que están dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documento.

Puede usarse una amplia variedad de vectores de expresión para expresar un marco de lectura abierta que codifique un FGFR3 e incluyen, sin suponer limitación, vectores de expresión vírica, vectores de expresión procariótica y vectores de expresión eucariótica, incluidos vectores de expresión de levaduras, insectos y mamíferos. Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión, junto con reactivos y condiciones bien establecidas para fabricar y usar un constructo de expresión de dichos vectores de expresión están disponibles fácilmente en suministradores comerciales, que incluyen, sin suponer limitación, BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos; Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos; EMD Biosciences-Novagen, Madison, WI, Estados Unidos; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos; y Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos. La selección, fabricación y uso de un vector de expresión apropiado son procedimientos rutinarios dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documento.

Se considera que cualquiera entre una variedad de sistemas de expresión puede ser útil para expresar composiciones de constructo divulgadas en la presente memoria descriptiva. Un sistema de expresión abarca tanto los sistemas basados en células como los sistemas de expresión exentos de células. Los sistemas basados en células incluyen, sin suponer limitación, sistemas de expresión vírica, sistemas de expresión procariótica, sistemas de expresión de levaduras, sistemas de expresión baculovíricos, sistemas de expresión de insectos y sistemas de expresión de mamíferos. Los sistemas exentos de células incluyen, sin suponer limitación, extractos de germen de trigo, extractos de reticulocito de conejo y extractos de *E. coli*. La expresión usando un sistema de expresión puede incluir cualquiera entre una variedad de características que incluyen, sin suponer limitación, expresión inducible, expresión no inducible, expresión constitutiva, expresión mediada víricamente, expresión integrada de forma estable

y expresión transitoria. Los sistemas de expresión que incluyen vectores, reactivos, condiciones y células bien caracterizados están bien establecidos y están fácilmente disponibles de suministradores comerciales que incluyen, sin suponer limitación, Ambion, Inc. Austin, TX, Estados Unidos; BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos; Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, Estados Unidos y Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos. En, por ejemplo, PROTEIN EXPRESSION. A PRACTICAL APPROACH (S. J. Higgins y B. David Hames ed., Oxford University Press, 1999); Joseph M. Fernandez y James P. Hoeffler, GENE EXPRESSION SYSTEMS. USING NATURE FOR THE ART OF EXPRESSION (Academic Press, 1999) y Meena Rai y Harish Padh, Expression Systems for Production of Heterologous Proteins, 80(9) CURRENT SCIENCE 1121-1128, (2001), se describen ejemplos no limitantes de la selección y el uso de sistemas de expresión heterólogos apropiados. Estos protocolos son procedimientos rutinarios que están dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documentos.

Un constructo de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 divulgado en la presente memoria descriptiva puede unirse operativamente a una variedad de elementos reguladores que pueden modular positiva o negativamente, bien directa o bien indirectamente, la expresión de una molécula de ácido nucleico tal como, por ejemplo, promotores y potenciadores constitutivos, específicos de tejido, inducibles o sintéticos. Los ejemplos no limitantes de elementos reguladores constitutivos incluyen, por ejemplo, elementos reguladores de citomegalovirus (CMV), timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV TK), virus de simio 40 (SV40) temprano, repetición terminal larga 5' (LTR), factor de elongación 1 α (EF-1 α) y polibiquitina (UbC). Ejemplos no limitantes de elementos reguladores inducibles útiles en aspectos de la presente invención incluyen, por ejemplo, elementos reguladores inducibles químicamente tales como, sin suponer limitación, regulados por alcohol, regulados por tetraciclina, regulados por esteroides, regulados por metal y relacionados con patogénesis y elementos reguladores inducibles físicamente tales como, sin suponer limitación, regulados por temperatura o regulados por la luz. Dichos elementos reguladores inducibles pueden prepararse y usarse mediante procedimientos estándar y están disponible en el mercado, incluidos, pero sin limitación elementos inducibles por tetraciclina y sensible a tetraciclina tales como, por ejemplo, Tet-On™ y Tet-Off™ (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos) y el T-REx™ (expresión regulada por tetraciclina) y sistemas Flp-In™ T-REx™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos); elementos reguladores inducibles por ecdisona tales como, por ejemplo, el sistema de expresión de mamífero inducible Complete Control® (Stratagene, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos); elementos reguladores inducibles por isopropil β -D-galactopiranosido (IPTG) tales como, por ejemplo, el sistema de expresión de mamífero inducible LacSwitch® II (Stratagene, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos); y elementos inducibles por esteroides tales como, por ejemplo, el sistema inducible por receptor de progesterona quimérica GeneSwitch™ (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos). El experto entiende que estos y una variedad de otros sistemas reguladores constitutivos e inducibles están disponibles en el comercio o son bien conocidos en la técnica y pueden ser útiles en la invención para controlar la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de BoNT/A.

En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 puede unirse opcionalmente a un elemento regulador tal como un elemento regulador constitutivo. En aspectos de la presente realización, una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de mamífero puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador constitutivo; una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de ave puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador constitutivo; una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de anfibio puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador constitutivo y una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de pez puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador constitutivo.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 puede unirse opcionalmente a un elemento regulador tal como un elemento regulador inducible. En aspectos de la presente realización, una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de mamífero puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador inducible; una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de ave puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador inducible; una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de anfibio puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador inducible y una molécula de ácido nucleico que codifica un FGFR3 de pez puede estar unido a un elemento regulador tal como un elemento regulador inducible. En otro aspecto de la presente realización, la expresión de la molécula de ácido nucleico se induce usando, por ejemplo, inducible por tetraciclina, inducible por ecdisona o inducible por esteroides.

Se entiende que un FGFR3 útil en aspectos de la presente invención puede incluir opcionalmente uno o varios componentes adicionales. Como ejemplo no limitante, una secuencia espaciadora flexible tal como secuencias de poliglicina puede estar incluida en un FGFR3 útil en la invención. Un FGFR3 útil puede incluir, sin suponer limitación, uno o varios de los siguientes: marcas de unión a epítopo, tales como, por ejemplo, FLAG, Express™, hemaglutinina del virus de la gripe humana (HA), proteína p62^{c-Myc} humana (c-MYC), glucoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G), precursor de glucoproteína-D de virus del herpes simple (HSV), V5 y AU1; unión de afinidad, tales como, por ejemplo, polihistidina (HIS), péptido de unión a estreptavidina (strep) y biotina o una secuencia de biotinilación; regiones de unión a péptido, tales como, por ejemplo, dominio de unión a glutatión de glutatión-S-transferasa, el dominio de unión a calmodulina de la proteína de unión a calmodulina y el dominio de unión a maltosa de la proteína de unión a maltosa; región bisagra de inmunoglobulina; un enlazador de N-

hidroxisuccinimida; un giro en horquilla peptídico o peptidomimético; o una secuencia hidrófila u otro componente o secuencia que, por ejemplo, promueva la solubilidad o estabilidad de un FGFR3. En, por ejemplo, Epitope Tagging, páginas 17.90-17.93 (Sambrook y Russell, ed., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Vol. 3, 3ª ed. 2001); Antibodies: A Laboratory Manual (Edward Harlow y David Lane, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1998) y Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol N° I (Edward Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998) se describen ejemplos no limitantes de protocolos específicos para seleccionar, fabricar y usar un péptido de unión apropiado. Además, ejemplos no limitantes de péptidos de unión así como reactivos, condiciones y protocolos bien caracterizados son fácilmente disponibles de suministradores comerciales que incluyen, sin suponer limitación, BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos; Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos y Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos. Estos protocolos son procedimientos rutinarios que están dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documentos.

Algunos aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, una célula que contiene un FGFR3 exógeno siendo dicha célula capaz de intoxicarse con BoNT/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula" significa cualquier célula eucariótica que expresa, o puede diseñarse para expresar, al menos un FGFR3 exógeno que se une a BoNT/A. el término célula abarca células de una variedad de organismos, tales como, por ejemplo, células murinas, de rata, porcinas, bovinas, equinas, de primate y humanas; de una variedad de tipos celulares tales como, por ejemplo, neuronales y no neuronales; y puede aislarse de, o parte de, una población celular heterogénea, tejido u organismo. Se entiende que las células útiles en aspectos de la invención pueden incluir, sin suponer limitación, células primarias; células cultivadas; células establecidas; células normales, células transformadas; células tumorales; células infectadas; células diferenciadas por proliferación y terminalmente y células transfectadas de forma estable o transitoria, incluidas las células transfectadas de forma estable y transitoria. Se entiende, además, que las células útiles en aspectos de la invención pueden estar en cualquier estado tal como de proliferación o quiescente, intactas o permeabilizadas como mediante transfección mediada químicamente, tal como, por ejemplo, mediada por fosfato de calcio, mediada por dietilaminoetil (DEAD) dextrano, mediada por lípidos, mediada por polietilenoimina (PEI), mediada por polibreno, y agentes de suministro de proteínas; transfección mediada físicamente, tal como, por ejemplo, suministro de partículas biolísticas, microinyección y electroporación; y transfección mediada víricamente, tal como, por ejemplo, transfección mediada por retrovirales. Se entiende, además, que células útiles en aspectos de la invención pueden incluir las que expresan un FGFR3 bajo control de un elemento promotor, elemento potenciador o ambos, constitutivo, específico de tejido, específico de célula o inducible.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula capaz de intoxicarse con BoNT/A" significa una célula que puede permitir el mecanismo celular total por el que la BoNT/A escinde proteolíticamente un sustrato tal como, por ejemplo, SNAP-25, y abarca la unión de BoNT/A a un receptor de afinidad baja o alta, la internalización del complejo toxina/receptor, la traslocación de la cadena ligera de BoNT/A al interior del citoplasma y la modificación diana enzimática de un sustrato de BoNT/A. Por definición, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A debe expresar un FGFR3. Como ejemplo no limitante, una célula neuronal o no neuronal puede diseñarse de forma transitoria o estable para expresar una molécula de ácido nucleico exógena que codifica un FGFR3. Como otro ejemplo no limitante, una célula neuronal o no neuronal puede diseñarse transitoriamente para que contenga un FGFR3 exógeno.

Las células útiles en aspectos de la invención incluyen tanto células neuronales como no neuronales. Las células neuronales útiles en aspectos de la invención incluyen, sin suponer limitación, células neuronales primarias; células neuronales inmortalizadas o establecidas; células neuronales transformadas; células tumorales neuronales; células neuronales transfectadas de forma estable o transitoria y además incluyen, sin estar limitadas a, células neuronales de mamífero, murinas, de rata, de primate y humanas. Ejemplos no limitantes de células neuronales útiles en aspectos de la invención incluyen, por ejemplo, células neuronales periféricas, tales como, por ejemplo, neuronas motoras y neuronas sensoriales; y células neuronales del SNC tales como, por ejemplo, neuronas de la médula espinal como neuronas de la médula espinal embrionarias, neuronas del ganglio espinal (DGR), neuronas del córtex cerebral, neuronas del cerebelo, neuronas del hipocampo y neuronas motoras. Las células neuronales útiles en la invención pueden ser, por ejemplo, neuronas del sistema nervioso central (SNC); células del neuroblastoma; neuronas motoras, neuronas del hipocampo o neuronas del cerebelo y además pueden ser, sin suponer limitación, células Neuro-2A, SH-SY5Y, NG108-15, N1E-115 o SK-N-DZ. El experto entiende que estas neuronas y neuronas adicionales primarias y establecidas pueden ser útiles en las células y procedimientos de la invención.

Las neuronas útiles en aspectos de la invención incluyen, sin suponer limitación, cultivos primarios tales como cultivos primarios de neuronas de ganglios espinales (DGR). Como ejemplo, en Mary J. Welch y col., Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins, 38(2) Toxicon 245-258 (2000) se describen cultivos primarios de neuronas DGR de rata embrionarias y en Elaine A. Neale y col., Botulinum neurotoxin A blocks synaptic vesicle exocytosis but not endocytosis at the nerve terminal, 147(6) J. Cell Biol. 1249-1260 (1999) y John A. Chaddock y col., Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and non-neuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of Clostridium botulinum neurotoxin type A, 68(5) Infect. Immun. 2587-2593 (2000) se describen cultivos primarios de neuronas de médula espinal fetal, por ejemplo, cultivos primarios de neuronas de médula espinal fetal murina. De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una neurona que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de la presente realización, una neurona puede ser

una neurona de, por ejemplo, un cultivo primario, un cultivo primario de ganglio espinal embrionario o un cultivo primario de médula espinal fetal. Como ejemplos no limitantes, las células útiles según un procedimiento divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula neuronal primaria que contenga un FGFR3 exógeno tal como, por ejemplo, una neurona de ganglio espinal (DRG) embrionario de rata que contenga un FGFR3 exógeno o una neurona de médula espinal fetal murina que contenga un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares neuronales útiles en aspectos de la invención incluyen, sin suponer limitación, líneas celulares de neuroblastoma, líneas celulares híbridas neuronales, líneas celulares de médula espinal, líneas celulares del sistema nervioso central, líneas celulares del córtex cerebral, líneas celulares de ganglio espinal, líneas celulares del hipocampo y líneas celulares de feocromocitoma.

Las líneas celulares de neuroblastoma, tales como, por ejemplo, líneas celulares de neuroblastoma murinas, de rata, de primate o humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención. Las líneas celulares de neuroblastoma útiles en aspectos de la invención incluyen, sin suponer limitación, BE (2)-C (ATCC CRL-2268; ECACC 95011817), BE(2)-M17 (ATCC CRL-2267; ECACC 95011816), C1300 (ECACC 93120817), CHP-212 (ATCC CRL-2273), CHP-126 (DSMZ ACC 304), IMR 32 (ATCC CRL-127; ECACC 86041809; DSMZ ACC 165), KELLY (ECACC 92110411; DSMZ ACC 355), LA-N-2; véase, por ejemplo, Robert C. Seeger y col., Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines, 37(5) Cancer Res. 1364-1371 (1977) y G. J. West y col., Adrenergic, cholinergic, and inactive human neuroblastoma cell lines with the action-potential Na⁺ ionophore, 37(5) Cancer Res. 1372-1376 (1977), MC-IXC (ATCC CRL-2270), MHH-NB-11 (DSMZ ACC 157), N18Tg2 (DSMZ ACC 103), N1E-115 (ATCC CCL-2263; ECACC 88112303), N4TG3 (DSMZ ACC 101), Neuro-2A (ATCC CCL-131; ECACC 89121404; DSMZ ACC 148), NB41A3 (ATCC CCL-147; ECACC 89121405), NS20Y (DSMZ ACC 94), SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; ECACC 94030304; DSMZ ACC 209), SIMA (DSMZ ACC 164), SK-NDZ (ATCC CRL-2149; ECACC 94092305), SK-N-F1 (ATCC CRL-2142, ECACC 94092304), SK-N-MC (ATCC HTB-10, DSMZ ACC 203) y SK-N-SH (ATCC HTB-11, ECACC 86012802). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula de neuroblastoma que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de la presente realización, una célula de neuroblastoma puede ser, por ejemplo, BE(2)-C, BE(2)-M17, C1300, CHP-212, CHP-126, IMR 32, KELLY, LA-N-2, MC-IXC, MHHNB- 11, N18Tg2, N1E-115, N4TG3, Neuro-2A, NB41A3, NS20Y, SH-SY5Y, SIMA, SK-N-DZ, SK-N-F1, SK-N-MC y SK-N-SH. Como ejemplos no limitantes, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A según un procedimiento divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula de neuroblastoma que contiene un FGFR3 exógeno tal como una célula SH-SY5Y que contiene un FGFR3 exógeno; una célula Neuro-2a que contiene un FGFR3 exógeno y una célula N1E-115 que contiene un FGFR3 exógeno y una célula SK-N-DZ que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares híbridas neuronales, tales como, por ejemplo, líneas celulares neuronales híbridas, pueden ser útiles en aspectos de la invención. Dichas líneas celulares híbridas incluyen híbridos de neuroblastoma/glioma tales como, por ejemplo, N18 (ECACC 88112301), NG108-15 (ATCC HB-12317, ECACC 88112302) y NG115-401L (ECACC 87032003); híbridos de neuroblastoma/neurona motora tales como, por ejemplo, NSC-19 y NSC-34, que expresan características de neurona motora, muestran un fenotipo similar a neurona multipolar, expresan niveles altos de colina acetiltransferasa (CHAT), generan potenciales de acción, expresan proteínas de triplete neurofilamentosas y sintetizan, almacenan y liberan acetilcolina; véase, por ejemplo, N. R. Cashman y col., Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons, 194(3) Dev. Dyn. 209-221 (1992) y Christopher J. Eggett y col., Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neuronal cell line, 74 (5) J. Neurochem. 1895-1902 (2000); híbridos de neuroblastoma/neurona de ganglio espinal, tales como, por ejemplo, F11; véase, por ejemplo, Doros Platika y col., Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells, 82(10) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 3499-3503 (1985), ND-E (ECACC 92090915), ND-U1 (ECACC 92090916), ND7/23 (ECACC 92090903), ND8/34 (ECACC 92090904) y ND27 (ECACC 92090912); híbridos de neuroblastoma/neurona de hipocampo tales como, por ejemplo, HN-33; véase, por ejemplo, Henry J. Lee y col., Neuronal properties and trophic activities of immortalized hippocampal cells from embryonic and young adult mice. 10(6) J. Neurosci. 1779-1787 (1990). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con toxina BoNT/A puede ser una neurona híbrida que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de la presente realización, una neurona híbrida puede ser, por ejemplo, una célula híbrida neuroblastoma/glioma que contiene un FGFR3 exógeno, una célula híbrida neuroblastoma/neurona motora que contiene un FGFR3 exógeno, una célula híbrida neuroblastoma/neurona de ganglio espinal que contiene un FGFR3 exógeno y una célula híbrida neuroblastoma/neurona de hipocampo que contiene un FGFR3 exógeno. En otros aspectos de esta realización, un híbrido de neuroblastoma/glioma puede ser, por ejemplo, N18, NG108-15 y NG115-401L. En otros aspectos de esta realización, un híbrido de neuroblastoma/neurona motora puede ser, por ejemplo, NSC-19 y NSC-32. En otros aspectos de esta realización, un híbrido de neuroblastoma/neurona de ganglio espinal puede ser, por ejemplo, F11, ND-E, ND-U1, ND7/23, ND8/34 y ND27. En otros aspectos de esta realización, un híbrido de neuroblastoma/neurona de hipocampo puede ser, por ejemplo, HN-33. Como ejemplos no limitantes, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A según un procedimiento divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula neuronal híbrida tal como, por ejemplo, una célula NG108-15 que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares de médula espinal tales como, por ejemplo, líneas celulares de médula espinal murinas, de rata, de primate o humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención e incluyen, sin suponer limitación, TE 189.T (ATCC CRL-7947) y M4b; véase, por ejemplo, Ana M. Cardenas y col., Establishment and characterization of

immortalized neuronal cell lines derived from the spinal cord of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of Down syndrome, 68(1) J. Neurosci. Res. 46-58 (2002). Como ejemplo, una línea celular de médula espinal humana puede generarse a partir de precursores de células de médula espinal embrionarias humanas (embrión del primer trimestre) que se immortalizan con un oncogén v-myc sensible a tetraciclina tal como se describe por Ronghao Li y col., Motoneuron differentiation of immortalized human spinal cord cell lines, 59(3) J. Neurosci. Res. 342-352 (2000). Dichas células pueden expandirse indefinidamente en condiciones de crecimiento proliferativas antes de una diferenciación rápida (4-7 días) en neuronas funcionales que expresan marcadores fenotípicos neuronales tales como colina acetiltransferasa. Como otro ejemplo, una línea celular de médula espinal murina puede prepararse immortalizando un cultivo de médula espinal embrionaria usando medio transformante. Dicha línea celular de médula espinal puede ser, por ejemplo, la línea M4b murina y puede expresar marcadores neuronales tales como NSE, sinaptofisina, MAP 2 y colina acetiltransferasa, y puede liberar acetilcolina después de la estimulación apropiada; véase, por ejemplo, Cardenas y col., anteriormente, (2002). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula de médula espinal que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de esta realización, una célula de médula espinal que contiene un FGFR3 exógeno puede ser, por ejemplo, una célula TE 189.T que contiene un FGFR3 exógeno y una célula M4b que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares del sistema nervioso central (SNC), tales como, por ejemplo, líneas celulares del SNC murinas, de rata, de primate y humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención. Una línea celular de SNC puede ser, por ejemplo, una línea del SNC immortalizada con un oncogén v-myc sensible a tetraciclina tal como se describe, por ejemplo, por Dinah W. Sah y col., Bipotent progenitor cell lines from the human CNS, 15(6) Nat. Biotechnol. 574-580 (1997). Después de la represión del oncogén, las células se diferencian en neuronas. De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula del SNC que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas de córtex cerebral tales como, por ejemplo, las líneas de córtex cerebral murinas, de rata, de primate y humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención e incluyen, sin suponer limitación, CNh, véase, por ejemplo, Ana M. Cardenas y col., Calcium signals in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice, 10(2) Neuroreport 363-369 (1999), HCN-1a (ATCC CRL-10442) y HCN-2 (ATCC CRL-10742). Como ejemplo, cultivos primarios de córtex murino de embriones de 12-16 días pueden immortalizarse, por ejemplo, cultivando las células en medio acondicionado a partir de líneas celulares de tiroides de rata que inducen transformación *in vitro*. Las células immortalizadas pueden diferenciarse en neuronas que expresan marcadores neuronales usando el medio apropiado; estas células diferenciadas expresan colina acetiltransferasa y segregan acetilcolina y glutamato en respuesta a despolarización y estimulación nicotínica, véase, por ejemplo, David D. Allen y col., Impaired cholinergic function in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice, 12(9) Eur. J. Neurosci. 3259-3264 (2000). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula del córtex cerebral que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de esta realización, una célula de córtex cerebral que contiene un FGFR3 exógeno puede ser, por ejemplo, una célula CNh que contiene un FGFR3 exógeno, una célula HCN-1a que contiene un FGFR3 exógeno y una célula HCN-2 que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares de ganglio espinal tales como, por ejemplo, líneas celulares de ganglio espinal murinas, de rata, de primate y humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención e incluyen, sin suponer limitación, G4b, véase, por ejemplo, David D. Allen y col., A dorsal root ganglia cell line derived from trisomy 16 fetal mice, a model for Down syndrome, 13(4) Neuroreport 491-496 (2002). Los cultivos primarios de ganglio espinal embrionario pueden immortalizarse con medio acondicionado de transformación tal como se ha descrito anteriormente. Después de la diferenciación, la línea celular muestra rasgos neuronales y carece de marcadores gliales por inmunohistoquímica. La liberación de neurotransmisores tales como acetilcolina puede inducirse en respuesta a potasio y nicotina, Allen y col., anteriormente, (2002). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula del ganglio espinal que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de esta realización, una célula de ganglio espinal puede ser, por ejemplo, una célula G4b que contiene un FGFR3 exógeno.

Las líneas celulares de hipocampo tales como, por ejemplo, líneas de hipocampo murinas, de rata, de primate y humanas pueden ser útiles en aspectos de la invención e incluyen, sin suponer limitación, HT-4, véase, por ejemplo, K. Frederiksen y col., Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS, 1(6) Neuron 439-448 (1988) y HT-22, véase, por ejemplo, John B. Davis and Pamela Maher, Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line, 652(1) Brain Res. 169-173 (1994). Como ejemplo no limitante, la línea celular de hipocampo HT-22 murina puede ser útil en la invención. Como ejemplo no limitante, la línea celular de hipocampo HN33 immortalizada puede ser útil en la invención. Esta línea celular de hipocampo se derivó de la fusión de neuronas primarias a partir del hipocampo de ratones de 21 días con la línea celular de neuroblastoma N18TG2 y, cuando se diferencian, comparten propiedades de membrana con neuronas de hipocampo adulto en cultivos primarios, véase, por ejemplo, Henry J. Lee y col., Neuronal Properties and Trophic Activities of Immortalized Hippocampal Cells from Embryonic and Young Adult Mice, 19(6) J. Neurosci. 1779-1787 (1990) y Henry J. Lee y col., Immortalized young adult neurons from the septal region: generation and characterization, 52(1-2) Brain Res. Dev Brain Res. 219-228 (1990). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula del hipocampo que contiene un FGFR3 exógeno. En aspectos de esta realización, una célula de hipocampo que contiene un FGFR3 exógeno puede ser, por ejemplo, una célula HT-4 que contiene un FGFR3 exógeno, una célula HT-22 que contiene un FGFR3 exógeno y una célula HN33 que contiene un FGFR3 exógeno.

Una diversidad de células no neuronales son útiles en aspectos de la invención. Las células no neuronales útiles en aspectos de la invención incluyen, sin suponer limitación, células no neuronales primarias; células no neuronales inmortalizadas o establecidas; células no neuronales transformadas; células tumorales no neuronales; células no neuronales transfectadas de forma estable o transitoria y además incluyen, sin estar limitadas a, células no neuronales de mamífero, murinas, de rata, de primate y humanas. Las células no neuronales útiles en aspectos de la invención también incluyen, sin suponer limitación, cualquiera de las células primarias o establecidas siguientes: células de la pituitaria anterior; células suprarrenales tales como, por ejemplo, células de cromafina de la médula suprarrenal; células pancreáticas tales como, por ejemplo, células acinares pancreáticas, células de los islotes K pancreáticas e células HIT o INS-1 del insulinoma; células de ovario tales como, por ejemplo, células de ovario productoras de esteroides; células renales tales como, por ejemplo, células del conducto colector medular interno (IMCD); células estomacales tales como, por ejemplo, células de enterocromafina; células sanguíneas tales como, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos; células epiteliales tales como, por ejemplo, las de la membrana plasmática apical; fibroblastos; células del tiroide; condrocitos; células musculares; hepatocitos; células glandulares tales como, por ejemplo, células de pituitaria, células suprarrenales, célula de cromafina; y células implicadas en la translocación del transportador de glucosa (GLUT4). De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula no neuronal. En aspectos de esta realización, una célula no neuronal puede ser de una línea celular no neuronal primaria o establecida de, por ejemplo, células de pituitaria anterior, células suprarrenales, células pancreáticas, células de ovarios, células renales, células de estómago, células sanguíneas, células epiteliales, fibroblastos, células de tiroides, condrocitos, células musculares, hepatocitos y células glandulares.

Como ejemplos no limitantes, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A según un procedimiento divulgado en la presente memoria descriptiva pueden incluir una célula no neuronal primaria o establecida que contiene un FGFR3 exógeno, tal como, por ejemplo, una célula de cromafina que contiene un FGFR3 exógeno o una célula acinar pancreática que contiene un FGFR3 exógeno; una célula neuronal primaria que contiene un FGFR3 exógeno.

Tal como se ha debatido anteriormente, las células útiles en la invención incluyen células neuronales y no neuronales que expresan niveles bajos o indetectables de receptor endógeno pero que han sido transfectadas con, o diseñadas de otro modo para expresar, una o varias moléculas de ácido nucleico que codifican uno o varios FGFR3. Las células útiles en aspectos de la presente invención también incluyen, sin suponer limitación, células transformadas, tumorales o de otro tipo que sobreexpresan uno o varios FGFR3 exógenos. Se entiende que el receptor sobreexpresado puede ser una forma natural del receptor o puede incluir una o varias modificaciones de aminoácidos en comparación con el receptor natural, con la condición de que el proceso de intoxicación con BoNT/A puede tener lugar aún. Como ejemplo no limitante, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A abarcan las que expresan o sobreexpresan un FGFR3 exógeno de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón. Como otro ejemplo no limitante, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A abarcan las que expresan o sobreexpresan un FGFR3 exógeno de ave, tal como, por ejemplo, FGFR3 de pollo. Como otro ejemplo no limitante, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A abarcan las que expresan o sobreexpresan un FGFR3 exógeno de anfibio, tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana. Como otro ejemplo no limitante, las células útiles para detectar la actividad de BoNT/A abarcan las que expresan o sobreexpresan un FGFR3 exógeno de pez, tal como, por ejemplo, FGFR3 de pez cebra.

De este modo, en una realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula que expresa de forma estable un FGFR3 exógeno. En aspectos de esta realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula que expresa de forma estable un FGFR3 exógeno de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón. En otros aspectos de esta realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula que expresa de forma estable un FGFR3 exógeno de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo. En otros aspectos de esta realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula que expresa de forma estable un FGFR3 exógeno de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana. En otros aspectos de esta realización, una célula capaz de intoxicarse con BoNT/A puede ser una célula que expresa de forma estable un FGFR3 exógeno de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra.

Aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, detectar la presencia de actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con relación a la célula de control, siendo una diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula de control indicativo de actividad de BoNT/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula de control" significa una célula del mismo tipo o similar que la célula puesta en contacto y cultivada en las mismas condiciones pero que no se ha puesto en contacto con ninguna muestra o se ha puesto en contacto con una muestra definida negativa o una muestra definida positiva. Un experto en la técnica entiende que una diversidad de células de control son útiles en los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva y que una célula de control puede ser una célula de control positivo o una célula de control negativo. Una célula de control puede ser, por ejemplo, una célula de control negativo tal como una célula similar o idéntica que contiene el mismo FGFR3 o similar que se pone en contacto con una muestra similar definida negativa que se sabe que carece de BoNT/A activo, o que no se pone en contacto con ninguna muestra. Una célula de control puede ser, por ejemplo una célula de control positiva tal como una célula similar o idéntica que contiene el

mismo FGFR3 o similar puesta en contacto con una muestra definida positiva que se sabe que incluye BoNT/A activo.

Puede usarse una amplia variedad de ensayos para determinar la presencia de actividad de BoNT/A, incluidos ensayos directos e indirectos de captación de toxina. Los ensayos para determinar las propiedades de unión o captación de BoNT/A pueden usarse para evaluar la actividad de BoNT/A. Dichos ensayos incluyen, sin suponer limitación, ensayos de reticulación usando BoNT/A etiquetada, tales como, por ejemplo, BoNT/ASBED; véase, por ejemplo, el ejemplo II de la presente memoria descriptiva y [¹²⁵I] BoNT/A; véanse, por ejemplo, Noriko Yokosawa y col., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa y col., Binding of botulinum type C, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29 (2) Toxicon 261-264 (1991) y Tei-ichi Nishiki y col., Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Otros ensayos no limitantes incluyen ensayos inmunocitoquímicos que detectan la unión a toxina usando anticuerpos marcados o no marcados; véase, por ejemplo, Atsushi Nishikawa y col., The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004), y ensayos de inmunoprecipitación; véase, por ejemplo, Yukako Fujinaga y col., Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004). Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, sin suponer limitación, anticuerpos seleccionados contra una BoNT/A, anticuerpos seleccionados contra un receptor de BoNT/A, tal como, por ejemplo, FGFR3, anticuerpos seleccionados contra un gangliósido, tal como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b y anticuerpos seleccionados contra un compuesto de ensayo, tal como, por ejemplo, una molécula que se une selectivamente al receptor de BoNT/A, modulando la unión selectiva la actividad de BoNT/A. Si el anticuerpo está marcado, la unión de la molécula puede detectarse usando diversos medios, incluidos inmunotransferencia (Western), observación microscópica directa de la localización celular del anticuerpo, medición de anticuerpo unido a la célula o al sustrato seguido de etapa de lavado o electroforesis, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Si el anticuerpo no está marcado, puede usarse un anticuerpo secundario marcado para la detección indirecta de la molécula unida y la detección puede realizarse como para un anticuerpo marcado. Se entiende que estos ensayos y otros similares que determinan las propiedades o características de captación de BoNT/A pueden ser útiles para detectar la actividad de BoNT/A.

Los ensayos de seguimiento de la liberación de una molécula tras exposición a BoNT/A también pueden ser útiles para evaluar la presencia de actividad de BoNT/A. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de la molécula tendría lugar en células que expresan un FGFR3 después del tratamiento con BoNT/A. Como ejemplo no limitante, con el ensayo de inhibición de la liberación de insulina divulgado en la presente memoria descriptiva puede realizarse un seguimiento de la liberación de una molécula tras exposición a BoNT/A y, por lo tanto, ser útil en la evaluación de si una molécula se une selectivamente a un receptor BoNT/A (véase el ejemplo I). Otros ensayos no limitantes incluyen procedimientos que miden la inhibición de la liberación de catecolamina radiomarcada desde neuronas, tales como, por ejemplo, la liberación de [³H] norepinephrine o [³H] dopamine; véase, por ejemplo, A Fassio y col., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999) y Sara Stigliani y col., The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), o miden la liberación de catecolamina usando procedimientos fluorométricos; véase, por ejemplo, Anton de Paiva y col., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin. A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence y col., Distinct exocytotic responses of intact and permeabilized chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); y Patrick Foran y col., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996); y procedimientos que miden la inhibición de liberación de hormonas desde células endocrinas, tales como, por ejemplo células de la pituitaria anterior o células de ovarios. Se entiende que estos ensayos y otros similares de análisis de liberación de moléculas pueden ser útiles para evaluar la actividad de BoNT/A.

Como ejemplos no limitantes, un ensayo de inhibición de liberación de insulina puede usarse para determinar la presencia de actividad de BoNT/A en células que contienen un FGFR3 y son capaces de segregar insulina; puede usarse un ensayo de inhibición de liberación de norepinephrine para determinar la actividad de BoNT/A en células que contienen un FGFR3 y son capaces de segregar norepinephrine y puede usarse un ensayo de inhibición de liberación de estrógeno para determinar la actividad de BoNT/A en células que contienen un FGFR3 y son capaces de segregar estrógeno.

Los ensayos para detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de exposición a BoNT/A también pueden usarse para evaluar la presencia de actividad de BoNT/A. En estos ensayos, la generación de un producto de escisión de BoNT/A se detectaría después del tratamiento con BoNT/A. Como ejemplo no limitante, en ensayo de escisión de SNAP-25 que se divulga en la presente memoria descriptiva puede detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de la exposición a BoNT/A y, por lo tanto, ser útil para evaluar la actividad de BoNT/A (véase el **ejemplo I**). Otros procedimientos no limitantes útiles para detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de la exposición a BoNT/A se describen por, por ejemplo, Lance E. Steward y col., FRET Protease Assays for

Botulinum Serotype A/E Toxins, Publicación de patente de Estados Unidos N°. 2003/0143650 (31 de julio, 2003) y Ester Fernandez-Salas y col., Cell-based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Assays for Clostridial Toxins, Publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0072270 (15 de abril, 2004). Se entiende que estos ensayos y otros similares para determinar la escisión del sustrato de BoNT/A pueden ser útiles para evaluar la actividad de BoNT/A.

Como ejemplos no limitantes, el análisis de inmunotransferencia (Western) usando un anticuerpo que reconoce el producto de escisión de SNAP-25 de BoNT/A puede usarse para determinar la presencia de actividad de BoNT/A. Los ejemplos de anticuerpos anti-SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, antisuero anti-SNAP25¹⁹⁷ policlonal de conejo pAb anti-SNAP25197 N° 1 (Allergan, Inc., Irvine, CA, Estados Unidos), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón SMI-81 (Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón SP12 (Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos), antisuero anti-SNAP-25 policlonal de conejo (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) y antisuero anti-SNAP-25 policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos).

Los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva incluyen, en parte, una muestra. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" significa cualquier material biológico que contenga o contenga potencialmente una BoNT/A activa. Puede analizarse una diversidad de muestras según un procedimiento divulgado en la presente memoria descriptiva que incluye, sin limitación, BoNT/A purificada, parcialmente purificada o no purificada; toxina monocatenaria o bicatenaria recombinante con una secuencia de origen natural o no natural; BoNT/A recombinante con una especificidad de proteasa modificada; BoNT/A recombinante con una especificada celular alterada; toxina quimérica que contiene elementos estructurales de múltiples especies o subtipos de BoNT/A; BoNT/A a granel; producto de BoNT/A formulado y alimentos; células o lisados celulares brutos fraccionados o parcialmente purificados, por ejemplo, diseñados para incluir un ácido nucleico recombinante que codifica un BoNT/A; lisados bacterianos, baculovíricos y de levadura; alimentos crudos, cocinados, parcialmente cocinados o procesados; refrescos; productos de alimentación de animales; muestras de suelo; muestras de agua; sedimentos de estanques; lociones; cosméticos y formulaciones clínicas. Se entiende que el término muestra abarca muestras de tejidos, incluidas, sin limitación, muestras de tejidos de mamíferos, muestras de tejidos de ganado tales como muestras de tejidos de oveja, vaca o cerdo, muestras de tejidos de primates y muestras de tejidos humanos. Dichas muestras abarcan, sin limitación, muestras intestinales tales como muestras intestinales de niños, muestras de tejidos obtenidas de una herida. Otras muestras de este tipo incluyen tejido de mamífero, saliva de mamífero, excreciones de mamífero y heces de mamífero. Como ejemplo no limitante, un procedimiento de la presente invención puede ser útil para detectar la presencia o actividad de una BoNT/A en una muestra de comida o bebida; para evaluar una muestra de un ser humano o de un animal, por ejemplo, expuesta a una BoNT/A o que tiene uno o varios síntomas de exposición a BoNT/A; para realizar un seguimiento de la actividad durante la producción y purificación de BoNT/A o para analizar productos de BoNT/A formulados tales como productos farmacéuticos o cosméticos.

Se considera que puede usarse una amplia variedad de formatos de procesamiento junto con los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva, incluidos, sin limitación, procesamiento manual, procesamiento parcialmente automatizado, procesamiento semiautomatizado, procesamiento totalmente automatizado, procesamiento de alto rendimientos, procesamiento de alto contenido y similares o cualquier combinación de los mismos.

Un aspecto de referencia proporciona procedimientos de reducción de la actividad de BoNT/A en un ser humano que comprenden administrar a dicho ser humano una composición farmacéutica que comprende una molécula que se une selectivamente a un FGFR3, en los que dicha unión selectiva reduce la capacidad de BoNT/A de unirse a dicho FGFR3. Se considera que cualquier molécula que puede unirse selectivamente a un FGFR3 de un modo que evita la unión de BoNT/A al mismo FGFR3 puede ser útil, incluidas, sin limitación, un anticuerpo anti-FGFR3, un FGF o un agonista de FGF. Además, un FGFR3, un fragmento de FGFR3 que mantiene la actividad de unión selectiva a BoNT/A o un peptidomimético del mismo también puede ser útil. Las moléculas que se unen selectivamente a FGFR3 y que, por lo tanto, son útiles en procedimientos para reducir la actividad de BoNT/A se describen por, por ejemplo, Avner Yayon y col., Antibodies that block receptor protein tyrosine kinase activation, methods of screening for and using thereof, Publicación internacional de patente WO 02/102972 (27 de diciembre, 2002); Avner Yayon y col., Antibodies that block receptor protein tyrosine kinase activation, methods of screening for and using thereof, Publicación internacional de patente N° WO 02/102973 (27 de diciembre, 2002) y Elisabeth Thomassen-Wolf y col., Antibodies that block receptor protein tyrosine kinase activation, methods of screening for and using thereof, Publicación internacional de patente N° WO 02/102854 (27 de diciembre, 2002).

Los aspectos de referencia proporcionan, en parte, un procedimiento para reducir la actividad de BoNT/A en un ser humano administrando una composición farmacéutica que comprende una molécula que se une selectivamente a un FGFR3. La composición administrada puede formularse en una variedad de medios farmacéuticamente aceptables, tal como se describe más adelante. Una dosis eficaz de una composición divulgada en la presente memoria descriptiva dependerá de la molécula particular seleccionada, la vía de administración y las características particulares del ser humano u otro mamífero, tales como la edad, el peso, el estado general de salud y similares.

Una dosis eficaz puede determinarse en un modelo animal antes de la administración a seres humanos. Las composiciones útiles en aspectos de la invención pueden administrarse usando una variedad de vías de estímulo y respuesta inmunitaria. Como ejemplo no limitante, la tolerancia oral está bien reconocida en la técnica (véase, por ejemplo, Weiner, Hospital Practice, páginas 53-58 (15 de septiembre, 1995). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente para una composición particular, una composición farmacológica adecuada, una carga útil de antígeno apropiada; la vía de administración; el volumen de la dosis y la pauta farmacéutica útil en un animal en particular, por ejemplo, seres humanos.

Tal como se divulga en el presente documento, una composición farmacéutica se administra a un ser humano o a otro mamífero para reducir la actividad de BoNT/A. Tal como se usa en el presente documento, el término "reducir" cuando se usa con referencia a la administración a un ser humano u otro mamífero de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica significa reducir un síntoma de una afección caracterizada por la exposición a la actividad de BoNT/A, o retrasar o evitar la aparición de un síntoma de una afección caracterizada por la exposición a la actividad de BoNT/A en el ser humano u otro mamífero. Por ejemplo, la expresión "que reduce" puede significar que reduce un síntoma de una afección caracterizada por la exposición a la actividad de BoNT/A en al menos el 30 %, 40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 %. La eficacia de una composición farmacéutica en el tratamiento de una afección caracterizada por la exposición a la actividad de BoNT/A puede determinarse observando uno o varios síntomas clínicos o indicadores fisiológicos asociados con la afección. Una mejora en una afección caracterizada por la exposición a la actividad de BoNT/A también puede indicarse por una necesidad reducida de una terapia simultánea. Los expertos en la técnica conocerán los síntomas apropiados o indicadores asociados con afecciones específicas y sabrán como determinar si un ser humano u otro mamífero es candidato al tratamiento con una composición farmacéutica que se divulga en la presente memoria descriptiva. En particular, se entiende que los expertos en la técnica serán capaces de determinar si una afección está caracterizada por una exposición a la actividad de BoNT/A comparando, por ejemplo, los niveles de actividad de BoNT/A del ser humano u otro mamífero con unas células de control normales.

Los expertos pueden determinar la cantidad eficaz apropiada para administrar para una aplicación particular de los procedimientos usando las guías que se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede extrapolarse a partir de ensayos tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Un experto en la técnica reconocerá que puede realizarse un seguimiento de la condición del paciente a lo largo de la terapia y que la cantidad eficaz de una composición que se administra puede ajustarse consecuentemente.

Una composición farmacéutica útil en aspectos de la invención se administra generalmente en una composición farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier entidad molecular o composición que no produce una reacción adversa, alérgica o de otro tipo perjudicial o no deseado cuando se administra a un ser humano o a otro mamífero. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéuticamente aceptable" se refiere a una concentración terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo. Una composición farmacéutica puede administrarse a un paciente sola o en combinación con otros ingredientes activos, agentes, fármacos u hormonas suplementarios. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse usando cualquier procedimiento de una diversidad de los mismos, incluidos, sin limitación, mezclado convencional, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulamiento, atrapamiento y liofilización. La composición farmacéutica puede tomar cualquier forma entre una diversidad de las mismas, que incluyen, sin limitación, una solución estéril, suspensión, emulsión, liofilizado, comprimido, pastilla, pella, cápsula, polvo, jarabe, elixir o cualquier otra forma farmacéutica adecuada para su administración.

Se contempla también que una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria descriptiva puede incluir, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable que facilita el procesamiento de un ingrediente activo en composiciones farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacológicamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo que no tenga un efecto negativo a largo plazo o permanente cuando se administra y abarca expresiones tales como "vehículo, estabilizante, diluyente, auxiliar o excipiente farmacológicamente aceptable". Un vehículo de este tipo se mezcla generalmente con un compuesto activo, o permite diluir o incluir el compuesto activo y puede ser un agente sólido, semisólido o líquido. Se entiende que los ingredientes activos pueden ser solubles en, o pueden proporcionarse en forma de suspensión a, el vehículo o diluyente deseado. Puede usarse cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable entre una diversidad de los mismos, incluidos, sin limitación, medios acuosos tales como, por ejemplo agua destilada, agua desionizada, solución salina; disolventes; medios dispersantes; recubrimientos; agentes antibacterianos y antifúngicos; agentes isotónicos y retardantes de la absorción o cualquier otro ingrediente inactivo. La selección de un vehículo farmacológicamente aceptable puede depender de la vía de administración. Excepto en la medida en que cualquier vehículo farmacológicamente aceptable sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitantes de usos específicos de dichos vehículos farmacéuticos pueden encontrarse en PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (Howard C. Ansel y col., ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7ª ed., 1999); REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20ª ed. 2000); GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (Joel G. Hardman y col., eds., McGraw-Hill Professional, 10ª ed., 2001) y HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS (Raymond C. Rowe

y col., APhA Publications, 4ª edición, 2003). Estos protocolos son procedimientos rutinarios y cualquier modificación está dentro del alcance de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documento.

Se considera además que una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria descriptiva puede incluir opcionalmente, sin limitación, otros componentes farmacéuticamente aceptables, incluidos, sin limitación, tampones, conservantes, ajustadores de la tonicidad, sales, antioxidantes, sustancias fisiológicas, sustancias farmacéuticas, agentes voluminizadores, agentes emulsionantes, agentes humectantes, edulcorantes o aromas y similares. Pueden usarse diversos tampones y medios para ajustar el pH para preparar una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria descriptiva, siempre que la preparación resultante sea farmacéuticamente aceptable. Dichos tampones incluyen, sin limitación, tampones de acetato, tampones de fosfato, soluciones salinas tamponadas a pH neutro, solución salina tamponada con fosfato y tampones de borato. Se entiende que pueden usarse ácidos o bases para ajustar el pH de una composición como sea necesario. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado. Los conservantes útiles incluyen, sin limitación, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico y una composición de oxiclono estabilizada, por ejemplo, PURITE®. Los ajustadores de la tonicidad en una composición farmacéutica incluyen, sin limitación, sales tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o glicerina y otros ajustadores de la tonicidad farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de sal y puede formarse con muchos ácidos, incluidos, pero no limitados a, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos o protónicos de otro tipo que las formas de base libre correspondientes. Se entiende que estas y otras sustancias conocidas en la técnica de la farmacología pueden incluirse en una composición farmacéutica útil en la invención.

Una composición farmacéutica útil en un procedimiento de la divulgación se administra a un ser humano o a otro mamífero en una cantidad eficaz. Dicha cantidad eficaz, generalmente, es la dosis mínima necesaria para lograr el efecto terapéutico deseado, que puede ser, por ejemplo, la cantidad aproximadamente necesaria para reducir los síntomas asociados con la exposición a la actividad de BoNT/A. Por ejemplo, la expresión "cantidad eficaz" cuando se usa con respecto al tratamiento de la exposición a la actividad de BoNT/A puede ser una dosis suficiente para reducir los síntomas, por ejemplo, en al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 %. Dicha dosis, generalmente, se encuentra en el intervalo de 0,1-1.000 mg/día y puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1-500 mg/día, 0,5-500 mg/día, 0,5-100 mg/día, 0,5-50 mg/día, 0,5-20 mg/día, 0,5-10 mg/día o 0,5-5 mg/día, con la cantidad real que se va a administrar determinada por un médico que tenga en cuenta las circunstancias pertinentes, incluida la gravedad de la exposición a la BoNT/A, la edad y el peso del paciente, la condición física general del paciente, la causa de la exposición a BoNT/A y la vía de administración. Cuando se usa una administración repetida, la frecuencia de la administración depende, en parte, de la semivida de la composición farmacéutica. Los supositorios y las formulaciones de liberación prolongada pueden ser útiles en la invención, e incluyen, por ejemplo, parches dérmicos, formulaciones para depositar sobre o debajo de la piel y formulaciones para inyección intramuscular. Se entiende que las formulaciones de liberación lenta también pueden ser útiles en los procedimientos de la invención. El sujeto que recibe la composición farmacéutica puede ser cualquier mamífero u otro vertebrado capaz de experimentar una exposición a la actividad de BoNT/A, por ejemplo, un ser humano, primate, caballo, vaca, perro, gato o ave.

Pueden ser útiles diversas vías de administración para reducir la actividad de BoNT/A según un procedimiento de la invención. Una composición farmacéutica útil en los procedimientos de la invención puede administrarse a un mamífero mediante cualquiera de entre una diversidad de medios dependiendo de, por ejemplo, el tipo y localización de la exposición a BoNT/A que se va a tratar, la composición farmacéutica u otro compuesto que está incluido en la composición, y el historial, factores de riesgo y síntomas del sujeto. Las vías de administración adecuadas para los procedimientos de la invención incluyen tanto la administración sistémica como la local. Como ejemplos no limitantes, una composición farmacéutica útil para reducir la actividad de BoNT/A puede administrarse oralmente o mediante bomba subcutánea; mediante parche dérmico; mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular; mediante gotas, cremas, geles o pomadas tópicas; como una formulación de liberación prolongada implantada o inyectada; como un sistema de liberación bioerodibles o no bioerodibles; mediante minibomba subcutánea u otro dispositivo implantado; mediante bomba o inyección intratecal o mediante inyección epidural. Una lista de ejemplos de polímeros biodegradables y de procedimientos de uso se describe, por ejemplo, en HANDBOOK OF BIODEGRADABLE POLYMERS (Abraham J. Domb y col., ed., Overseas Publishers Association, 1997); CONTROLLED DRUG DELIVERY: DESIGNING TECHNOLOGIES FOR THE FUTURE (Kinam Park y Randy J. Mersny ed., American Chemical Association, 2000); Vernon G. Wong, Method for Reducing or Preventing Transplant Rejection in the Eye and Intraocular Implants for Use Therefor, documento de patente de Estados Unidos N° 6.699.493 (2 de marzo, 2004); Vernon G. Wong y Mae W. L. Hu, Methods for Treating Inflammation-mediated Conditions of the Eye, documento de patente de Estados Unidos N° 6.726.918 (27 de abril, 2004); David A. Weber y col., Methods and Apparatus for Delivery of Ocular Implants, documento de patente de Estados Unidos N° US2004/0054374 (18 de marzo, 2004); Thierry Nivaggioli y col., Biodegradable Ocular Implant, documento de patente de Estados Unidos N° US2004/0137059 (15 de julio, 2004). Se entiende que la frecuencia y duración de la dosificación dependerá, en parte, del alivio deseado y de la semivida de la composición tolerogénica.

En realizaciones particulares, un procedimiento de la invención se pone en práctica mediante administración periférica de una composición farmacéutica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión

"administración periférica" o "administrado periféricamente" significa introducir un agente en un sujeto fuera del sistema nervioso central. La administración periférica abarca cualquier vía de administración diferente a la administración directa a la médula espinal o al cerebro. Como tal, está claro que la administración intratecal y epidural, así como la inyección o implantación craneal no están dentro del ámbito de la expresión "administración periférica" o "administrado periféricamente".

La administración periférica puede ser local o sistémica. La administración local da como resultado que se administran más de una composición farmacéutica a, y alrededor de, el sitio de administración local que a regiones que distan del sitio de administración. La administración local da como resultado el suministro de una composición farmacéutica a esencialmente la totalidad del sistema nervioso periférico del sujeto y también puede dar como resultado el suministro al sistema nervioso central dependiendo de las propiedades de la composición.

Las vías de administración periférica útiles en los procedimientos de la invención abarcan, sin limitación, administración oral, administración tópica, intravenosa u otra inyección, y minibombas implantadas y otros dispositivos o formulaciones de liberación prolongada. Una composición farmacéutica útil en la invención puede administrarse periféricamente, por ejemplo, oralmente en cualquier forma aceptables tal como en un comprimido, líquido, cápsula, polvo o similar; mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o parenteral; mediante difusión transdérmica o electroforesis; tópicamente en cualquier forma aceptables tal como en gotas, cremas, geles o pomadas; y mediante una minibomba u otro dispositivo o formulación de liberación prolongada implantado.

Otros aspectos de la presente invención proporcionan procedimientos para seleccionar una molécula capaz de competir con el BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A poniendo en contacto dicha muestra con una composición que comprende un FGFR3 y detectando si dicha molécula se une selectivamente a dicho FGFR3, en los que la unión selectiva de dicha molécula a dicho FGFR3 indica que dicha molécula es capaz de competir con BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A y en los que si dicha molécula es BoNT/A, dichos procedimientos no comprenden un ensayo de DL₅₀. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "unión selectiva" significa que un agente de unión es capaz de unirse a su diana en condiciones fisiológicas, o en condiciones *in vitro* que sustancialmente se aproximen a las condiciones fisiológicas (es decir, tiene una K_d o constante de disociación inferior) que a otra molécula no diana de la superficie de la célula neuronal. "K_d" es la concentración molar del agente de unión a la que están unidas la mitad de las moléculas diana al agente de unión. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ensayo DL₅₀" significa un ensayo *in vivo* sobre la base de animales vivos de la actividad de neurotoxinas que comprende detectar la dosis de neurotoxina a la que el 50 % de los animales tratados muere, véase, por ejemplo, el ensayo de protección de ratones (MPA), Charles L. Hatheway y Carol Dang, Immunogenicity of the Neurotoxins of Clostridium botulinum, 93-107 (Neurological Disease and Therapy-THERAPY WITH BOTULINUM TOXIN, Joseph Jankovic y Mark Hallett ed., Marcel Dekker, 1994).

Se considera que cualquiera de las condiciones de ensayo, y todas ellas, adecuados para analizar una molécula capaz de competir con BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A puede ser útil, por ejemplo, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, se prevé también que puede usarse una amplia diversidad de formatos de procesamiento junto con los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva, incluidos, sin limitación, procesamiento manual, procesamiento parcialmente automatizado, procesamiento semiautomatizado, procesamiento totalmente automatizado, procesamiento de alto rendimiento, procesamiento de alto contenido y similares o cualquier combinación de los mismos.

Tal como se ha divulgado anteriormente, cualquiera de los procedimientos útiles para detectar la actividad de BoNT/A divulgado en la presente memoria descriptiva y cualquiera de las composiciones útiles para poner en práctica los procedimientos útiles para detectar la actividad de BoNT/A divulgado en la presente memoria descriptiva puede ser útil para analizar una molécula que compita con BoNT/A para unirse selectivamente a un FGFR3. Así, en un aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico de un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de pájaro tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En otro aspecto de la presente realización, el FGFR3 puede ser un FGFR3 de mamífero tal como, por ejemplo, un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de rata o un FGFR3 de ratón; un FGFR3 de ave tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pollo; un FGFR3 de anfibio tal como, por ejemplo, un FGFR3 de tritón o un FGFR3 de rana; y un FGFR3 de pez tal como, por ejemplo, un FGFR3 de pez cebra. En otro aspecto de esta realización, un FGFR3 útil para analizar una molécula que compita con BoNT/A para unirse selectivamente al FGFR3 puede estar incluido de forma transitoria o estable en una célula. En otro aspecto de esta realización, una composición útil para analizar una molécula que compite con BoNT/A por unirse selectivamente a un FGFR3 comprende un FGFR3 y opcionalmente un polilisialigangliósido G1b tal como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b.

En otro aspecto de esta realización, una célula puede incluir células, tales como, por ejemplo, células neuronales que incluyen, sin limitación, células neuronales primarias; células neuronales inmortalizadas o establecidas; células neuronales transformadas; células tumorales neuronales; células neuronales transfectadas de forma estable o transitoria que expresan un FGFR3, y también incluyen, aunque no están limitadas a, células neuronales de

mamífero, murinas, de rata, de primate y humanas. Otros aspectos de la invención incluyen células de, tales como, por ejemplo, líneas celulares neuronales que incluyen, sin limitación, líneas celulares de neuroblastoma, líneas celulares híbridas neuronales, líneas celulares de médula espinal, líneas celulares del sistema nervioso central, líneas celulares del córtex cerebral, líneas celulares de ganglio espinal, líneas celulares del hipocampo y líneas celulares de feocromocitoma. Los ejemplos de líneas celulares neuronales incluyen, por ejemplo, las líneas celulares de neuroblastoma BE(2)-C, BE(2)-M17, C1300, CHP-212, CHP-126, IMR 32, KELLY, LA-N-2, MC-IXC, MHH-NB-11, N18Tg2, N1E-115, N4TG3, Neuro-2A, NB41A3, NS20Y, SH-SY5Y, SIMA, SK-N-DZ, SK-N-F1, SK-N-MC y SK-N-SH; las líneas celulares híbridas de neuroblastoma/glioma N18, NG108-15 y NG115-401L; las líneas celulares híbridas de neuroblastoma/neurona motora NSC-19 y NSC-32; las líneas celulares híbridas de neuroblastoma/neurona de ganglio espinal F11, ND-E, ND-U1, ND7/23, ND8/34 y ND27; la línea celular híbrida de neuroblastoma/neurona de hipocampo HN-33; las líneas celulares de médula espinal TE 189.T y M4b; las líneas celulares de córtex cerebral CNh, HCN-1a y HCN-2; la línea celular de ganglio espinal G4b; las líneas celulares de hipocampo HT-4, HT-22 y HN33; las líneas celulares que expresan FGFR3 H929, JIM-3, KMS-11, KMS-18, LB278, LB375, LB1017, LB2100, LP-1, OPM-2, PCL1 y UTM-2. En otros aspectos de esta realización, una célula que expresa FGFR3 puede ser, por ejemplo, H929, JIM-3, KMS-11, KMS-18, LB278, LB375, LB1017, LB2100, LP-1, OPM-2, PCL1 UTM-2, B9, TC, L6 y CFK2. Otros aspectos de esta realización incluyen células, tales como, por ejemplo, células neuronales que incluyen, sin limitación, células no neuronales primarias; células no neuronales inmortalizadas o establecidas; células no neuronales transformadas; células tumorales no neuronales; células no neuronales transfectadas de forma estable o transitoria que expresan un FGFR3, y también incluyen, aunque no están limitadas a, células no neuronales de mamífero, murinas, de rata, de primate y humanas. Otros aspectos de esta realización incluyen células tales como, por ejemplo, células no neuronales útiles en aspectos de la invención que incluyen, sin limitación, células de la pituitaria anterior; células suprarrenales, células pancreáticas, células de ovario, células renales, células de estómago, células sanguíneas, células epiteliales, fibroblastos, células de tiroides, condrocitos, células musculares, hepatocitos, células glandulares y células implicadas en la translocación del transportador de glucosa (GLUT4).

La molécula que se va a analizar en el procedimiento de análisis puede ser un compuesto orgánico "pequeño" de origen sintético, o puede ser una macromolécula (bien de origen sintético o bien natural), incluido, sin limitación, un polipéptido, tal como, por ejemplo, un factor del crecimiento, una neurotoxina, una neurotoxina modificada, un anticuerpo o un derivado de anticuerpo, un ácido nucleico, tal como, por ejemplo un aptámero; y un polisacárido, tal como, por ejemplo, un gangliósido o una lectina. En una realización, la molécula es una molécula sintética diseñada sobre la base de la estructura terciaria y conformación tridimensional de FGF o un anticuerpo que inhibe la unión de BoNT/A a un FGFR3. Dicha análisis de SAR (relación estructura/actividad) es rutinario en la técnica de la química medicinal, entre otros campos.

Puede usarse una amplia diversidad de ensayos para determinar si una molécula se une selectivamente a FGFR3, incluidos ensayos directos e indirectos de captación de toxina. Los ensayos para determinar las propiedades de unión o captación de BoNT/A pueden usarse para evaluar si una molécula se une selectivamente a un FGFR3. Dichos ensayos incluyen, sin limitación, ensayos de reticulación usando BoNT/A marcada, tales como, por ejemplo, T/ASBED; véase, por ejemplo, el ejemplo II de la presente memoria descriptiva y [¹²⁵I] BoNT/A; véanse, por ejemplo, Noriko Yokosawa y col., Binding of Clostridium botulinum type C neurotoxin to different neuroblastoma cell lines, 57(1) Infect. Immun. 272-277 (1989); Noriko Yokosawa y col., Binding of botulinum type C, D and E neurotoxins to neuronal cell lines and synaptosomes, 29 (2) Toxicon 261-264 (1991) y Tei-ichi Nishiki y col., Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes, 269(14) J. Biol. Chem. 10498-10503 (1994). Otros ensayos no limitantes incluyen ensayos inmunocitoquímicos que detectan la unión a toxina usando anticuerpos marcados o no marcados; véase, por ejemplo, Atsushi Nishikawa y col., The receptor and transporter for internalization of Clostridium botulinum type C progenitor toxin into HT-29 cells, 319(2) Biochem. Biophys. Res. Commun. 327-333 (2004), y ensayos de inmunoprecipitación; véase, por ejemplo, Yukako Fujinaga y col., Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes, 150(Pt 5) Microbiology 1529-1538 (2004). Los anticuerpos útiles para estos ensayos incluyen, sin suponer limitación, anticuerpos seleccionados contra una BoNT/A, anticuerpos seleccionados contra un receptor de BoNT/A, tal como, por ejemplo, FGFR3, anticuerpos seleccionados contra un gangliósido, tal como, por ejemplo, GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b y anticuerpos seleccionados contra un compuesto de ensayo, tal como, por ejemplo, una molécula que se une selectivamente al receptor de BoNT/A, modulando la unión selectiva la actividad de BoNT/A. Si el anticuerpo está marcado, la unión de la molécula puede detectarse usando diversos medios, incluidos inmunotransferencia (Western), observación microscópica directa de la localización celular del anticuerpo, medición de anticuerpo unido a la célula o al sustrato seguido de etapa de lavado o electroforesis, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Si el anticuerpo no está marcado, puede usarse un anticuerpo secundario marcado para la detección indirecta de la molécula unida y la detección puede realizarse como para un anticuerpo marcado. Se entiende que estos y otros ensayos similares que determinan las propiedades o características de captación de BoNT/A pueden ser útiles para seleccionar una neurona u otras células en aspectos de la invención.

Los ensayos de seguimiento de la liberación de una molécula tras exposición a BoNT/A también pueden ser útiles para evaluar si una molécula se une a FGFR3. En estos ensayos, la inhibición de la liberación de la molécula tendría lugar en células que expresan un FGFR3 después del tratamiento con BoNT/A. Como ejemplo no limitante, con el

ensayo de inhibición de la liberación de insulina divulgado en la presente memoria descriptiva puede realizarse un seguimiento de la liberación de una molécula tras exposición a BoNT/A y, por lo tanto, ser útil en la evaluación de si una molécula se une selectivamente a FGFR3 (véase el ejemplo I). Otros ensayos no limitantes incluyen procedimientos que miden la inhibición de la liberación de catecolamina radiomarcada desde neuronas, tales como, por ejemplo, la liberación de [³H] norepinephrine o [³H] dopamine; véase, por ejemplo, A Fassio y col., Evidence for calcium-dependent vesicular transmitter release insensitive to tetanus toxin and botulinum toxin type F, 90(3) Neuroscience 893-902 (1999) y Sara Stigliani y col., The sensitivity of catecholamine release to botulinum toxin C1 and E suggests selective targeting of vesicles set into the readily releasable pool, 85(2) J. Neurochem. 409-421 (2003), o miden la liberación de catecolamina usando procedimientos fluorométricos; véase, por ejemplo, Anton de Paiva y col., A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin. A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly, 268(28) J. Biol. Chem. 20838-20844 (1993); Gary W. Lawrence y col., Distinct exocytotic responses of intact and permeabilized chromaffin cells after cleavage of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) or synaptobrevin by botulinum toxin A or B, 236(3) Eur. J. Biochem. 877-886 (1996); y Patrick Foran y col., Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release, 35(8) Biochemistry 2630-2636 (1996); y procedimientos que miden la inhibición de liberación de hormonas desde células endocrinas, tales como, por ejemplo células de la pituitaria anterior o células de ovarios. Se entiende que estos ensayos y otros similares de análisis de liberación de moléculas pueden ser útiles para evaluar si una molécula se une selectivamente a FGFR3.

Como ejemplos no limitantes, un ensayo de inhibición de liberación de insulina puede usarse para analizar si una molécula se une selectivamente a FGFR3 en una célula que contiene FGFR3 capaz de segregar insulina; un ensayo de inhibición de liberación de noradrenalina puede usarse para analizar si una molécula se une selectivamente a FGFR3 en una célula que contiene FGFR3 capaz de segregar noradrenalina y un ensayo de inhibición de liberación de estrógeno puede usarse para analizar si una molécula se une selectivamente a FGFR3 en una célula que contiene FGFR3 capaz de segregar estrógeno.

Los ensayos para detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de exposición a BoNT/A también pueden usarse para evaluar si una molécula se une selectivamente a un FGFR3. En estos ensayos, la generación de un producto de escisión de BoNT/A se detectaría en células que expresan un FGFR3 después del tratamiento con BoNT/A. Como ejemplo no limitante, en ensayo de escisión de SNAP-25 que se divulga en la presente memoria descriptiva puede detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de la exposición a BoNT/A y, por lo tanto, ser útil para evaluar si una molécula se une selectivamente a un receptor de BoNT/A (véase el ejemplo I). Otros procedimientos no limitantes útiles para detectar la escisión de un sustrato de BoNT/A después de la exposición a BoNT/A se describen por, por ejemplo, Lance E. Steward y col., FRET Protease Assays for Botulinum Serotype A/E Toxins, Publicación de patente de Estados Unidos N°. 2003/0143650 (31 de julio, 2003) y Ester Fernandez-Salas y col., Cell-based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Assays for Clostridial Toxins, Publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0072270 (15 de abril, 2004). Se entiende que estos ensayos y otros similares de escisión de sustrato de BoNT/A pueden ser útiles para evaluar si una molécula se une selectivamente a FGFR3.

Como ejemplos no limitantes, el análisis de inmunotransferencia (Western) usando un anticuerpo que reconoce el producto de escisión de SNAP-25 de BoNT/A puede usarse para determinar si una molécula se une selectivamente a FGFR3. Los ejemplos de anticuerpos anti-SNAP-25 útiles para estos ensayos incluyen, sin limitación, antisuero anti-SNAP25¹⁹⁷ policlonal de conejo pAb anti-SNAP25197 N° 1 (Allergan, Inc., Irvine, CA, Estados Unidos), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón SMI-81 (Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón CI 71.1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón CI 71.2 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania), anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón SP12 (Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos), antisuero anti-SNAP-25 policlonal de conejo (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) y antisuero anti-SNAP-25 policlonal de conejo (Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos).

Los ensayos que detectan la unión competitiva de una molécula con BoNT/A para unirse selectivamente a un FGFR3 también pueden usarse para evaluar si una molécula se une selectivamente a un FGFR3. En estos ensayos, una reducción en la actividad de BoNT/A se detectaría como que la cantidad de una molécula que compite con BoNT/A para unirse selectivamente a un BoNT/A aumentaría. En un ejemplo no limitante, el ensayo de inhibición competitiva usando ligandos FGF divulgados en la presente memoria descriptiva puede usarse para detectar la unión competitiva de una molécula con BoNT/A para unirse selectivamente a un FGFR3 y, por lo tanto, ser útil para evaluar si una molécula se une selectivamente a un receptor de BoNT/A (véase el ejemplo II). De este modo, en un aspecto de esta realización, los ensayos de unión competitiva que usan una molécula de unión a FGFR3 con BoNT/A para unirse selectivamente a FGFR3 pueden usarse para evaluar si una molécula se une selectivamente a un FGFR3.

Otros aspectos de referencia proporcionan procedimientos para hacer una célula susceptible de escindir proteínas SNARE mediante BoNT/A, que comprenden inducir dicha célula a expresar un FGFR3. Otros aspectos de referencia proporcionan procedimientos para hacer una célula susceptible de escindir proteínas SNARE mediante BoNT/A, que comprenden inducir de forma transitoria a dicha célula a expresar un FGFR3. Otros aspectos de referencia

proporcionan procedimientos para hacer una célula susceptible de escindir proteínas SNARE mediante BoNT/A, que comprenden inducir de forma estable a dicha célula a expresar un FGFR3.

Otros aspectos de referencia proporcionan procedimientos de comercialización de una neurotoxina capaz de unirse selectivamente al mismo FGFR3 que BoNT/A que comprenden obtener la aprobación de comercialización de una autoridad reguladora gubernamental o regional para una neurotoxina terapéutica, en los que dicha neurotoxina se analiza para evaluar su unión selectiva a una célula que comprende poner en contacto dicha neurotoxina con una composición que comprende un FGFR3 y detectar si dicha neurotoxina se une selectivamente a dicho FGFR3, en los que la unión selectiva de dicha neurotoxina a dicho FGFR3 indica que dicha neurotoxina es capaz de unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A y en los que si dicha molécula es BoNT/A, dichos procedimientos no comprenden un ensayo de DL₅₀; envasar dicha neurotoxina para su venta de un modo consecuente con los requerimientos de dicha autoridad reguladora y vender dicha neurotoxina.

Otros aspectos de referencia proporcionan procedimientos de comercialización de una neurotoxina capaz de unirse selectivamente al mismo FGFR3 que BoNT/A que comprenden obtener la aprobación de comercialización de una autoridad reguladora gubernamental o regional para una neurotoxina terapéutica, en los que dicha neurotoxina se analiza para evaluar su unión selectiva a una célula que comprende poner en contacto dicha neurotoxina con una célula que contiene un FGFR3 exógeno en los que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectar la presencia de actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con relación a una célula control, siendo indicativo de la actividad de BoNT/A una diferencia en la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control; envasar dicha neurotoxina para su venta de un modo consecuente con los requerimientos de dicha autoridad reguladora y vender dicha neurotoxina.

En otro aspecto de referencia, la memoria descriptiva se refiere a un polipéptido que comprende al menos la región Hc de BoNT/A, que se produce a partir de una preparación en masa o formulada, en el que la preparación en masa o formulada se analiza para evaluar la unión específica a células neuronales usando un procedimiento que comprende poner en contacto dicho polipéptido con una composición que comprende un receptor FGFR3 y, opcionalmente, un gangliósido GT1b y detectar si dicho polipéptido se une selectivamente a FGFR3.

En otra realización similar al aspecto de la invención anterior, el polipéptido comprende al menos un dominio de unión a FGFR3 diferente al dominio Hc de BoNT/A. Dicho dominio de unión puede comprender, por ejemplo, un FGF, tal como FGF 1, FGF2, FGF4, FGF8 o FGF 9, o un anticuerpo anti-FGFR3. Además, el polipéptido puede contener opcionalmente un dominio de traslocación tal como el dominio H_N de BoNT/A. Adicionalmente, el polipéptido contendrá generalmente una cadena ligera de neurotoxina clostridial o variación de la misma, la naturaleza y/o fuente de la cadena ligera puede proporcionar diferencias en la amplitud y la semivida del efecto terapéutico del polipéptido.

De este modo, en esta realización, el polipéptido reivindicado se produce (producción que puede incluir etapas de purificación, tratamiento enzimático y/o oxidación) a partir de una preparación en masa o en formulación. En una realización, la preparación puede ser, por ejemplo, un lisado celular producido a partir de la fermentación de una cepa de *Clostridium botulinum* productora de BoNT/A, o a partir de de una célula huésped de mamífero, de insecto o bacteriana que produce una versión recombinante de BoNT/A. Dicha preparación en masa también puede producirse usando metodologías de transcripción exentas de células. En otra realización, la preparación puede ser BoNT/A purificada formulada con proteínas estabilizantes asociadas, tales como albúmina de suero. En cada caso, la preparación puede comprender moléculas de BoNT/A que se desnaturalizan o se pliegan incorrectamente de otro modo de tal modo que no se unen a las células diana. La potencia y/o actividad específica de la preparación, o de las fracciones purificadas de la preparación, puede detectarse usando el procedimiento de ensayo reivindicado.

Alternativamente, el polipéptido que se va a analizar puede comprender sólo una porción de la molécula de BoNT/A completa. Por ejemplo, la preparación en masa puede contener solo la cadena pesada de BoNT/A, como producción por separado de las cadenas pesada y ligera de la toxina puede ser una ruta preferente de evitar la exposición accidental a la neurotoxina por parte de técnicos de laboratorio.

Como otro ejemplo de la realización anterior, el polipéptido puede comprender un polipéptido recombinante quimérico que contiene la región Hc de la cadena pesada de BoNT/A (o algún otro resto de unión a FGFR3, tal como e mismo FGF). El polipéptido quimérico comprende regiones de secuencias de aminoácidos adicionales a, o distintas a, las que están presentes en una molécula de BoNT/A natural. Por ejemplo, las toxinas botulínica y del tetanus pueden usarse como base para la creación de proteínas de transporte, véase, por ejemplo, James Oliver Dolly y col., Modification of clostridial toxins for use as transport proteins, documento de patente de Estados Unidos N° 6.203.794 (20 de marzo, 2001). La cadena ligera de estas proteínas de transporte generalmente o bien se reemplazan por un resto terapéutico o se inactivan y se acoplan a dicho resto terapéutico. Adicionalmente, las neurotoxinas quiméricas pueden fabricarse de modo que comprendan polipéptidos que contienen dominios de más de una neurotoxina., James Oliver Dolly y col., Activatable Recombinant Neurotoxins, Publicación internacional N° WO 01/14570 (1 de marzo, 2001). De este modo, este aspecto de la invención también comprende, como una realización, neurotoxinas quiméricas que contienen al menos el dominio HC de BoNT/A. Dichas moléculas pueden ser útiles en la modulación del tiempo o la extensión de la inhibición de la liberación de vesículas secretoras. Además, puede ser deseable para dirigir agents, tales como agentes terapéuticos, a la superficie extracelular de la

membrana celular neuronal. De este modo, un agente puede unirse (por ejemplo, como una proteína de fusión o mediante conjugación postraslacional) a la porción Hc de BoNT/A. En tal caso, el lisado celular o mezcla de reacción de conjugación puede comprender una preparación en lote según este aspecto de la invención.

Los polipéptidos a los que se ha hecho referencia anteriormente se analizan para evaluar su unión y/o internalización esencialmente como se ha mencionado anteriormente en la realización del procedimiento de análisis descrito.

En otra realización más, un aspecto de referencia se refiere a un procedimiento de comercialización de un polipéptido que contiene una región capaz de unirse al receptor FGFR3 que comprende obtener el permiso de una autoridad reguladora de fármacos regional o gubernamental para vender dicho polipéptido, en el que dicho polipéptido se produce primeramente como una preparación en masa que se analiza para evaluar la unión selectiva de dicho polipéptido a células neuronales poniendo en contacto la preparación en masa que contiene dicho polipéptido con una composición que comprende un receptor FGFR3 y, opcionalmente, el gangliósido GT1b y detectar si dicho polipéptido se une selectivamente a FGFR3 en dichas condiciones, envasar dicho polipéptido para su venta de un modo consecuente con los requerimientos de dicha autoridad reguladora y ofrecer dicho polipéptido en el mercado.

Este aspecto se refiere a un procedimiento de comercialización de un polipéptido que contiene la región HC de una toxina BoNT/A. El polipéptido en cuestión es esta realización de la invención se produce a partir de una preparación en masa que se analiza para evaluar la pureza o actividad usando el procedimiento de análisis descrito previamente. En una etapa de este procedimiento, el permiso se obtiene de un organismo regulador para la comercialización de dicho polipéptido. En este contexto "permiso" puede ser tácito o expreso; es decir, el permiso o la aprobación pueden obtenerse de la autoridad reguladora para la venta de un agente terapéutico o composición que comprende dicho polipéptido, en cuyo caso "permiso" es aprobación de comercialización para la venta de dicho agente o composición. Alternativamente, "permiso", tal como se usa en el presente documento puede comprender el asentimiento, tanto dado de forma afirmativa o manifestado en su falta de objeciones, de dicha autoridad reguladora para la venta continua de un producto que contiene un polipéptido analizado de este modo nuevo. Como anteriormente, el polipéptido puede comprender BoNT/A, o un derivado de la misma, o una proteína de fusión o conjugado que contiene la región Hc de la cadena pesada de BoNT/A.

El producto terapéutico que comprende el polipéptido contenido originalmente en la preparación en masa analizado de este modo se etiqueta según los requerimientos de la autoridad reguladora. Después, el producto se ofrece para su venta. Ofrecer para su venta puede comprender actividad de promoción o venta, seminarios educativos dirigidos a médicos, hospitales, mutuas o pacientes, conversaciones con organismos oficiales locales, regionales o gubernamentales que tratan el reembolso de ayudas (tales como Medicare o Medical en Estados Unidos).

Ejemplos

Ejemplo I

Identificación de un receptor de BoNT/A usando una complementación genética

Procedimiento 1. Identificación de células útiles en el cribado de un receptor de BoNT/A

1a. Identificación de células que carecen del receptor de BoNT/A usando un ensayo de inhibición de la liberación de insulina

Para determinar si las células HIT-T15 expresan un receptor para BoNT/A, se realizó un ensayo de inhibición de liberación de insulina. En respuesta a la estimulación con glucosa, la línea celular de insulinoma de hámster HIT-T15 segrega insulina en un proceso exocítico que depende de la actividad de SNAP-25 para el anclaje y fusión a la vesícula. Si las células HIT-T15 carecen de un receptor de BoNT/A, estas células serían incapaces de captar BoNT/A después de una exposición a esta toxina y la secreción de insulina podría tener lugar en presencia de alta glucosa en el medio. No obstante, si las células HIT-T15 contienen un receptor de BoNT/A, la secreción de insulina sería inhibida después del tratamiento con BoNT/A debido a que la toxina podría intoxicar la célula y escindir el SNAP-25.

Para realizar un ensayo de inhibición de la liberación de insulina, se plaqueó una densidad celular adecuada de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml de células HIT-T15 en pocillos individuales de placas de cultivo hístico recubiertas con poli-D-lisina/laminina de 6 pocillos que contenían 3 ml de medio Tagle modificado de Dulbecco completo (DMEM), suplementado con suero de bovino fetal (FBS) al 10 %, 1 x solución de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y glutamina 4 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), y se cultivó en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzaron una densidad de aproximadamente 5×10^5 células/ml (6-16 horas). Un grupo de células HIT-T15 se trató con una concentración aproximadamente 1 nM de PURE-A mediante introducción de la toxina por electroporación usando un juego GENE PULSER® II a 960 µF y 0,28 kV (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Un grupo de control no tratado se sometió a electroporación sin PURE-A. El medio de los pocillos que contenía células electroporadas tratados y no tratadas se reemplazó por 3 ml de DMEM completo nuevo suplementado con bien

glucosa 5,6 mM (baja glucosa) o bien glucosa 25 mM (alta glucosa) y estas células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 1 hora para inducir la secreción de insulina. El medio acondicionado se transfirió a tubos de 15 ml y se determinó la cantidad de insulina presente en las muestras de medio acondicionado usando un ensayo ELISA de insulina (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, Estados Unidos). La exocitosis se expresa como la cantidad de insulina segregada por $1,5 \times 10^5$ células/hora. La liberación de insulina se detectó en células no tratadas con BoNT/A estimuladas por glucosa 25 mM, pero la secreción de insulina se inhibió en células tratadas con BoNT/A (véase la figura 3a). Estos datos indican que la liberación de insulina en células HIT-T15 está mediada, en parte, por SNAP-25, pero que éstas carecen de un receptor de BoNT/A.

1b. Identificación de células que carecen del receptor de BONT/A usando un ensayo de escisión de SNAP-25

Para determinar si las células HIT-T15 expresan un receptor para BoNT/A, se realizó un ensayo de escisión de SNAP-25. Si las células HIT-T15 carecen de un receptor de BoNT/A, entonces solo se detectaría la presencia de sustrato SNAP-25 mediante un análisis de inmunotransferencia (Western). Sin embargo, si las células HIT-T15 contienen un receptor de BoNT/A, entonces la toxina podría intoxicar la célula y se detectaría la presencia de producto de SNAP-25₁₉₇ de BoNT/A escindido.

Para realizar un ensayo de escisión de SNAP-25, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina y se trataron con PURE-A tal como se ha descrito en el ejemplo I, 1a. Las células se recogieron en tubos de 15 ml, se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, y se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Las células se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(3-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X[®] 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V), con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos siliconizados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior.

Para detectar la presencia de sustrato BoNT/A escindido, las muestras se hirvieron durante 5 min, y se separaron partes alícuotas de 40 µl por electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de poliacrilamida preformados con bis-tris al 4-12 % NuPAGE[®] Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en condiciones reductoras desnaturizantes. Los péptidos separados se transfirieron del gel a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) mediante inmunotransferencia (Western) usando un aparato celular de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Las membranas de PVDF se bloquearon incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución que contenía solución salina tamponada con tris 25 mM (ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol clorhídrico 25 mM (Tris-HCl)(pH 7,4), cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM), TWEEN-20[®] al 0,1 %, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, albúmina de suero bovino al 2 %, leche desnatada seca al 5 %. Las membranas bloqueadas se incubaron a 4 °C durante la noche en solución salina tamponada con tris TWEEN-20[®] (solución salina tamponada con tris 25 mM, TWEEN-20[®] al 0,1 %, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán) que contenía una dilución 1:5.000 de antisuero anti-SNAP25 policlonal de conejo pAb anti-SNAP25197 N° 1, un anticuerpo policlonal que es específico para el producto de escisión de SNAP25₁₉₇ y no reacciona de forma cruzada con SNAP-25₂₀₆ de longitud completa (Allergan, Inc., generado mediante contrato con Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos). Las manchas analizadas de anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en solución salina tamponada con tris TWEEN-20[®]. Las membranas lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en solución salina tamponada con tris TWEEN-20[®] que contenía una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anti-conejo policlonal de cabra, conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) como anticuerpo secundario. Las manchas analizadas de anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en solución salina tamponada con tris TWEEN-20[®]. La detección del producto de escisión de SNAP25₁₉₇ de BoNT/A se visualizó usando el sistema de detección mediante inmunotransferencia (Western) ECL Plus[™] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos) y se realizó una imagen de la membrana y el producto de escisión se cuantificó con un programa informático captador de imágenes en modo variable y de análisis del captador de imágenes Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos). La elección del tamaño en píxeles (100 a 200 píxeles) y los ajustes de voltaje PMT (350 a 600, normalmente 400) dependió de la mancha individual. Se detectó un producto de escisión de SNAP25₁₉₇ de BoNT/A en células HIT-T15 tratadas con BoNT/A, pero no en células no tratadas, lo que indica que las células HIT-T15 expresan SNAP-25 pero no el receptor de BoNT/A (véase la figura 3b).

1c. Evaluación de la exposición a la BoNT/A sobre el crecimiento de HIT-T15

Para evaluar si la presencia de toxina en las células afecta al crecimiento celular, se electroporaron células HIT-T15 tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1a y se realizó un seguimiento durante 10 días. La figura 4a demuestra que la presencia de la toxina retrasa el crecimiento en comparación con los controles, pero las células tratadas con toxina eran capaces de replicarse normalmente después de un periodo de recuperación. También se analizaron partes alícuotas celulares durante los días 3, 5, 7 y 10 para evaluar la presencia del producto de escisión

de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A usando el ensayo de escisión de SNAP-25 tal como se ha descrito en el ejemplo I, 1b. La figura 4b muestra que la escisión de SNAP-25 se detectó mediante análisis de inmunotransferencia (Western) en todos los puntos temporales analizados cuando se introdujo PURE-A en las células.

2. Identificación del receptor de BoNT/A usando complementación genética

Para identificar un receptor de BoNT/A se clonó una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de BoNT/A por complementación genética. Este procedimiento implica la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de BoNT/A en una línea celular que no contiene el receptor de forma natural por transducción retroviral; véase, por ejemplo, Mitchell H. Finer y col., Methods for Production of High Titer Virus and High Efficiency Retroviral Mediated Transduction of Mammalian Cells, documento de patente de Estados Unidos N° 5.858.740 (12 de julio, 1999).

2a. Producción de una solución madre retroviral que contiene los constructos de expresión pLIB

Para producir una solución madre retroviral que contiene los constructos de expresión que codifican moléculas de ácido nucleico de cerebro humano, se plaquearon aproximadamente 5×10^5 células basadas en HEK 293 (células AmphoPack™ 293; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos) en placas de cultivo hístico de 60 mm que contenían 5 ml medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) completo, suplementado con suero de bovino fetal (FBS) al 10 %, 1x solución de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y glutamina 4mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzaron del 60 % al 80 % de confluencia o una densidad de aproximadamente 1 a 2×10^6 células/ml (12-24 horas). El día de la transfección, el medio DMEM completo suplementado se reemplazó por 3 ml de medio en suero reducido OPTI-MEM. Se preparó una solución de transfección de 500 µl añadiendo 250 µl de medio en suero reducido OPTI-MEM que contenía 15 µl de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos a 250 µl de medio en suero reducido OPTI-MEM que contenía 5 µg de moléculas de ácido derivadas de células cerebrales humanas que contenían constructos de expresión retroviral pLIB (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Esta transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. Después, la solución de transfección de 500 µl se añadió a las células AmphoPack™ 293 y las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 8-10 horas. El medio de transfección se reemplazó por 3 ml de DMEM completo suplementado nuevo y las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 48-72 horas. Las células que contienen retrovirus se recogen separando las células usando el medio de cultivo y raspando células de la placa de cultivo. Las células separadas y el medio se transfieren a un tubo de 15 ml y se centrifugan ($5,000 \times g$ a 20 °C durante 15 minutos) para formar pellas con los desechos celulares. El sobrenadante clarificado que contiene las partículas retrovirales se transfiere a crioviales de 2 ml en partes alícuotas de 1 ml y debería contener aproximadamente de 5×10^4 a 5×10^6 ut/ml de partículas retrovirales. Las partes alícuotas pueden almacenarse a -80 °C hasta que se necesiten.

2b. Transducción de células con una solución madre retroviral que contiene los constructos de expresión pLIB

Para transducir células con una solución madre retroviral que contiene los constructos de expresión que codifican moléculas de ácido nucleico de cerebro humano, se plaquearon aproximadamente 5×10^5 células HIT-T15 en placas de cultivo hístico de 60 mm que contenían 5 ml medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) completo, suplementado con suero de bovino fetal (FBS) al 10 %, 1x solución de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y glutamina 4 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzaron del 60 % al 80 % de confluencia o una densidad de aproximadamente 5×10^5 células/ml (6-16 horas). Se inocula a las células solución madre retroviral que contiene moléculas de ácido nucleico derivadas de células cerebrales humanas (véase el ejemplo I, 2a), usando una multiplicidad de infección adecuada. Después se añadieron aproximadamente 4-8 µg/ml de polibreno y las células se incubaron durante aproximadamente 16-24 horas en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 %. El medio de transfección se reemplazó por 5 ml de DMEM completo suplementado nuevo y las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 4 días. Las células transducidas se usaron después para realizar un ensayo de cribado para identificar un receptor de BoNT/A. Para más detalles sobre los procedimientos descritos en este ejemplo, véase Retroviral Gene Transfer and Expression User Manual PT3132-1 (PR43789), BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos (3 de marzo, 2004).

2c. Cribado de células HIT-T15 que expresan una biblioteca de ADNc retroviral

Para cribar células que expresan un receptor de BoNT/A, se analizaron células HIT-T15 transducidas tal como se describe en el ejemplo I, 2b sobre la base de su capacidad de unirse a perlas Dynex recubiertas con Pure A (ref). Se añadieron aproximadamente 7,5 mg de perlas magnéticas Dynabeads® (DynaL Biotechnology, LLC, Brown Deer, WI, Estados Unidos) recubiertas con un anticuerpo contra la cadena ligera de BoNT/A al medio durante 30 minutos a 4 °C y las células unidas a la cadena ligera de BoNT/A se aislaron como grupos de células después de la exposición a

un imán. Estas células aisladas se lavaron una vez con PBS y se transfirieron a placas de cultivo hístico nuevas de 60 mm que contenían 5 ml de DMEM completo. Estas células se volvieron a cribar con 7,5 mg de perlas magnéticas Dynabeads® recubiertas con PURE-A durante 30 minutos a 4 °C y las células unidas a PURE-A se aislaron como grupos de células después de la exposición a un imán (véase la figura 5). Estas colonias celulares reaisladas se transfirieron a placas de 96 pocillos que contenían 0,25 ml de DMEM complete y las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta confluencia.

El análisis de la presencia de un receptor de BoNT/A en células individuales contenidas en placas de 96 pocillos se llevó a cabo usando el ensayo de inhibición para el ensayo de liberación de insulina, tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1a. Las líneas celulares que contenían un receptor de BoNT/A se seleccionaron sobre la base de la detección de la inhibición de liberación de insulina. La figura 6 muestra que las líneas celulares HIT-T15 transducidas C6 y C7 como líneas celulares candidatas que expresan un receptor de BoNT/A. Para confirmar estos resultados, los cultivos de clones C6 y C7 se expanden tal como se han descrito anteriormente en el ejemplo I, 2a y se analizan usando el ensayo de inhibición de liberación de insulina y el ensayo de escisión de SNAP-25 tal como se han descrito en el ejemplo I, 1b. Los resultados indican que un receptor BoNT/A está presente en estas líneas celulares sobre la base de la inhibición de la liberación de insulina (véase la figura 7a) y la presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A (véase la figura 7b).

2d. Clonación de un receptor de BoNT/A

Para aislar moléculas de ácido nucleico que codifican el receptor de BoNT/A, se purificará ADN de aislados de células HIT-T15 que contienen receptor de BoNT/A identificados anteriormente en el ejemplo I, 2c y la molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de BoNT/A se clonará usando el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El AND genómico de la línea celular C7 se aislará mediante un procedimiento de lisis alcalina y se amplificará mediante reacciones PCR usando el kit de PCR ADVANTAGE® Genomic (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estados Unidos) y los dos oligonucleótidos siguientes 5'-AGCCCTCACTCCTTCTCTAG- 3' (SEC ID N°: 29) y 5'-ACCTACAGGTGGGGTCTTTC ATTCCC-3' (SEC ID N°: 30). Las reacciones se incubarán a 95 °C durante 1 minuto, seguido por 25 ciclos a 68 °C durante 30 segundos y 95 °C durante 30 segundos, seguido por 1 ciclo a 68 °C de 6 minutos y una incubación final a 4 °C. El producto de PCR resultante se purificará mediante reacción PCR usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos) y se someterán a una segunda amplificación PCR. Los oligonucleótidos usados en la segunda PCR serán cebadores anidados diseñados para hibridarse a secuencias encontradas dentro del producto de PCR purificado originalmente y tendrán las secuencias de nucleótidos siguientes: 5'-CCCTGGGTCAAGCCCTTGTACACC- 3' (SEC ID N°: 31) y 5'-TGCCAAACCTACA GGTGGGGTCTTT-3' (SEC ID N°: 32). El producto de ADN anidado resultante se subclonará en un vector pTOPO®-XL usando el procedimiento de clonación TOPO® TA (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La mezcla de ligación se transformará en células E. coli TOP10 químicamente competentes (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando un procedimiento de choque térmico, se plaqueará en placas de agar Luria-Bertani al 1,5 % (pH 7,0) que contenía 100 µg/ml de ampicilina, y se situarán en una incubadora a 37 °C para su cultivo durante la noche. Las colonias resistentes a ampicilina se analizarán usando un procedimiento de minipreparación de plásmido de lisis alcalino y se cribarán constructo de receptores candidatos por cartografiado de endonucleasa de restricción para determinar la presencia y la orientación del fragmento de inserto correcto. Los cultivos que contienen el constructo de expresión deseado se usarán para inocular matraces con deflectores de 1 l que contienen 200 ml de medio Luria-Bertani que contiene 100 µg/ml de ampicilina y se situarán en una incubadora a 37 °C, agitando a 250 rpm, para un cultivo durante la noche. El ADN del plásmido purificado correspondiente a un constructo de expresión se aislará usando el procedimiento QIAGEN Maxi-prep (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, Estados Unidos) y se secuenciará para verificar que se ha fabricado el constructo de expresión correcto (contrato de servicio con Sequetech Corp., Mountain View, CA, Estados Unidos). Esta estrategia de clonación identificará la composición de secuencia del receptor de BoNT/A contenido en el aislado HIT-T15 C7.

Ejemplo II

Identificación de un receptor de BoNT/A usando un procedimiento de reticulación

Procedimiento 1. Identificación de líneas celulares con captación de alta afinidad para BoNT/A

Pueden esperarse diversas sensibilidades para cada uno de los serotipos de BoNT sobre la base de los sistemas de receptores individuales para cada una de los diferentes serotipos de toxina y su expresión diferente en diferentes líneas celulares. La presencia en una célula de un sistema receptor de alta afinidad para BoNT puede caracterizarse mediante dos atributos: una captación rápida de la neurotoxina por parte de la célula y una concentración baja de neurotoxina necesaria para la intoxicación celular. Para identificar una línea celular que tenga un sistema receptor de alta afinidad por una BoNT/A, analizamos líneas celulares usando uno de dos ensayos de escisión *in vitro* diferentes, uno para determinar la cantidad de toxina requerida para la intoxicación y otro para determinar la duración de tiempo necesario para que la célula capte la neurotoxina.

1a. Ensayo para determinar la concentración de BoNT/A necesaria para la intoxicación de la célula

Con el fin de evaluar la cantidad de BoNT/A necesaria para intoxicar una célula, se cribó un panel de líneas celulares de mamífero de origen neuronal (véase la tabla 3) para determinar si la exposición a la toxina daría como resultado la escisión de SNAP-25 expresado de forma endógena. Una densidad de semillas adecuada de células de cada línea se plaqueó en pocillos individuales de placas de cultivo hístico de 6 pocillos recubiertas con poli D-lisina/laminina que contenían 3 ml de un medio adecuado (véase la tabla 3) y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante 24 horas. Se añadió BoNT/A (Metabionics, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) a diferentes concentraciones (0 nM, 1 nM, 5 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50nM) al medio de cultivo que contenía las células durante aproximadamente 8 o aproximadamente 16 horas. Las células se recogieron en tubos de 15 ml, se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, y después se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Las células se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(K-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X® 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V), con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos silicinizados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior.

La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se determinó mediante inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1b. Un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se detectó en las líneas celulares SH-SY5Y, NG108-15, N1E-115, Neuro-2A y SK-N-BE(2) después de una incubación de al menos 8 horas con al menos BoNT/A 5 nM, indicando de este modo la capacidad de BoNT/A de intoxicar estas líneas celulares (véase la figura 8a).

La línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro-2A se analizó adicionalmente con bajas concentraciones de BoNT/A para determinar la concentración de neurotoxina necesaria para escindir SNAP-25 expresado de forma endógena. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos recubiertos con poli-D-lisina/laminina tal como se ha descrito en el ejemplo II, 1a. Se añadió BoNT/A (Metabionics, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) a diferentes concentraciones (0 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM y 20 nM) al medio de cultivo que contenía las células durante aproximadamente 8 o aproximadamente 16 horas. Las células tratadas con toxina se recogieron y se lisaron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se determinó usando análisis de inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. Se detectó un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A en la línea celular Neuro-2A después de una incubación de al menos 8 horas con al menos BoNT/A 0,5 nM, indicando de este modo la capacidad de BoNT/A de intoxicar estas líneas celulares (véase la figura 8c).

1b. Ensayo para determinar el tiempo requerido por una célula para captar BoNT/A

Con el fin de evaluar la cantidad de tiempo necesario para que una línea celular capte BoNT/A, se cribó un panel de líneas celulares de mamífero de origen neuronal para determinar la duración de la exposición a la toxina necesaria para escindir el SNAP-25 expresado de forma endógena. Las células de cada línea se cultivaron en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. Se añadió BoNT/A aproximadamente 1 nM (Metabionics, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) al medio de cultivo durante 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas o 16 horas. Las células tratadas con toxina se recogieron y se lisaron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se determinó usando análisis de inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. Se detectó un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A en las líneas celulares Neuro-2A, SH-SY5Y y NG108-15 después de una incubación de al menos 8 horas con BoNT/A 1 nM, indicando de este modo la capacidad de estas líneas celulares para captar rápidamente BoNT/A (véase la figura 8b).

TABLA 3 Condiciones de cultivo para líneas celulares			
Línea celular	Medio de cultivo completo	Condiciones de paso	Densidad de siembra (células/mm ²)
SK-N-DZ	DMEM al 90 %, A	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:4 división cada 2-3 días	4,25 x 10 ³
SK-N-F1	DMEM al 90 %, A	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:4 división 2 veces por semana	4,25 x 10 ³
SK-N-SH	de Ham F12, DMEM o EMEM, B	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:20 división cada 4-7 días	4,25 x 10 ³
SH-SY5Y	EMEM y de Ham F12 1:1, C	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:6 división cada 2-3 días	4,25 x 10 ³
SK-N-BE(2)	EMEM y de Ham	Tratamiento con tripsina/EDTA,	4,25 x 10 ³

	F12 1:1, D	dilución 1:6 división cada 3 días	
BE(2)-C	EMEM y de Ham F12 1:1, D	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:4 división cada 2-3 días	4,25 x 10 ³
BE(2)-M17	EMEM y de Ham F12 1:1, D	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:20 división cada 4-7 días	4,25 x 10 ³
Neuro 2a	EMEM, E	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
C1300	RPMI 1640, B	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
NB4 1A3	de Ham F10,F	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
NIE-115	EMEM, G	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
NG108-15	EMEM, B	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:4 división cada 2	4,25 x 10 ³
HCN-1A	EMEM, H	dilución 1:4 división cada 1-2 días	4,25 x 10 ³
HCN-2	EMEM, H	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
TE 189.T	EMEM, H	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
ND8/34	EMEM, B	Tratamiento con tripsina/EDTA, dilución 1:3 división cada 3 días	4,25 x 10 ³
A contiene 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 nM, glutamina 4 nM y suero de carnero fetal (FCS) al 10 % B contiene glutamina 2mM y FCS al 10 % C contiene 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 nM, glutamina 4 nM, piruvato de sodio al 1 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y FCS al 10 % D contiene NEAA 0,1 nM, glutamina 4mM y FCS al 10 % E contiene 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1 nM, glutamina 2 nM, piruvato de sodio al 1 % y FCS al 10 % F contiene glutamine 2 nM, suero de caballo al 15 % y FCS al 2,5 % G contiene 4,5 g/l de glucosa FCS al 10 % H contiene glucosa 4 nM y FCS al 10 % El medio de congelación comprende medio de cultivo al 95 % y DMSO al 5 %			

1c. Tratamiento con gangliósidos para aumentar la captación de alta afinidad de BoNT/A por una célula

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento con gangliósido sobre la capacidad de BoNT/A para intoxicar una célula, se trató previamente una línea celular Neuro-2A con diferentes gangliósidos para determinar si estos restos de azúcar podrían aumentar la captación de BoNT/A por estas células. Las células Neuro-2A se plaquearon a una densidad adecuada en pocillos individuales de placas de cultivo hístico de seis pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina que contenían 3 ml de un medio adecuado (véase la tabla 3) y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 %. Después de aproximadamente 24 horas, el medio se reemplaza por un medio exento de suero y se añadieron 25 µg/ml de uno de los gangliósidos siguientes a pocillos individuales: GD1a, GD1b, GD3, GQ1b or GT1b (AXXORA, LLC, San Diego, CA, Estados Unidos). Después de un periodo de incubación a 37 °C, las células tratadas con gangliósidos se lavaron tres veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfatos, pH 7,4 y después se incubaron a 37 °C con medio de suero al 1 % que contenía distintas concentraciones (0 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50nM) de BoNT/A (Metabionics, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) durante aproximadamente 8 horas o aproximadamente 16 horas. Las células se recogieron en tubos de 15 ml, se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, y se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Las células se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(□-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X[®] 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V), con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos siliconizados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior. La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se determinó usando análisis de inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a. Un aumento de producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se detectó en la línea celular Neuro-2A tratada con el gangliósido GT1b, indicando de este modo que el tratamiento con GT1b puede aumentar la captación de BoNT/A por células Neuro- 2A (véase la figura 9a).

1d. Tratamiento con gangliósidos para aumentar la captación de alta afinidad de BoNT/E por una célula

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento con gangliósido sobre la capacidad de BoNT/E para intoxicar una célula, se pretrató una línea celular Neuro-2A con diferentes gangliósidos para determinar si estos restos de azúcar podrían aumentar la captación de BoNT/A por estas células. Las células Neuro-2A se cultivaron en placas de seis pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina y se trató con gangliósidos tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1c. Las células tratadas con gangliósidos se incubaron con BoNT/E (Metabionics, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) a distintas concentraciones (0 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM) en medio de suero al 1 % durante bien aproximadamente 6 horas o bien aproximadamente 16 horas. Las células tratadas con toxina se recogieron y se lisaron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1c. La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁸⁰ de BoNT/E se determinó mediante análisis inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1b, con la excepción de que las membranas PVDF bloqueadas se incubaron en un solución de anticuerpo primario que contenía una dilución 1:50.000 de anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón (SMI-81; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos) mejor que el antisuero anti-SNAP25 policlona de conejo pAb anti-SNAP25197 N° 1 y una solución de anticuerpo secundario que contenía una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anti-ratón policlona de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) mejor que el anticuerpo IgG-HRP anti-conejo policlona de cabra con el fin de detectar el producto de escisión de SNAP25¹⁸⁰ de BoNT/E. Un aumento de producto de escisión de SNAP25¹⁸⁰ de BoNT/E se detectó en la línea celular Neuro-2A tratada con los gangliósidos GD3, GD1b y GD1a, indicando de este modo que el tratamiento con GD3, el tratamiento con GD1b o el tratamiento con GD1a puede aumentar la captación de BoNT/E por células Neuro-2A (véase la figura 9b).

2. Aislamiento del receptor de BoNT/A a partir de células Neuro-2A

Las células Neuro-2A se eligieron para realizar experimentos de reticulación de ligandos usando BoNT/A debido a que estas células tienen un perfil de captación de toxina rápido (aproximadamente 10 minutos) y alta afinidad por BoNT/A. Se usó el sulfo-SBED (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) trifuncional. El reactivo sulfo-SBED contiene tres grupos reactivos (uno de ellos diseñada para ser activado mediante UV) y está diseñado para biotinar una proteína diana.

Para conjugar un agente de reticulación a un BoNT/A, se centrifugan aproximadamente 100 µg de Pure A a 10,000 x g a 4 °C durante 10 minutos para formar pellas de toxina y se lleva a un volumen final de 900 µl de solución salina tamponada con fosfatos (pH 7,4). La solución se lleva a continuación a la oscuridad y se añaden 900 µl de SBED 0,25 mM, solución de DMSO al 1 % y se incubaba a 4 °C durante dos horas en un recipiente secundario sobre un aparato agitador. La reacción se detiene añadiendo 50 µl de TRIS 1 M (pH 7,4). La solución se invierte 6 veces y se incubaba sobre hielo durante 30 minutos. La solución PURE-ASBED resultante se usó para realizar los experimentos de reticulación para identificar un receptor BoNT/A.

Para reticular PURE-A a receptores de BoNT/A presentes en células Neuro-2A, se plaquero 1,5 x 10⁵ células Neuro-2A en una placa de cultivo hístico de 35 mm que contenía 3 ml de EMEM completo, suplementado con FBS al 10 %, glutamine 2 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5 g/l de carbonato de sodio y 1 x MEM de solución de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se cultiva en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono hasta que las células alcanzan una densidad de aproximadamente 5 x 10⁵ células/ml. Las células Neuro-2A se recogieron separando las células con un tratamiento de tripsina, transfiriendo las células a tubos de 15 ml y centrifugando las células a 5,000 x g a 4 °C durante 10 min. El sedimento de células se lava tres veces con 9 ml de solución salina tamponada con Tris y después se divide en partes alícuotas de 4 x 10⁵ células. Cada parte alícuota de células se suspende en 12 ml de solución salina tamponada con Tris para dar una densidad final de 2 x 10⁷ células/ml y se situaron sobre hielo durante 15 minutos. A una parte alícuota de suspensión celular, se añade 1 ml de PURE-A-SBED, siendo la concentración final de aproximadamente 100 µg de PURE A (33 nM). A una segunda parte alícuota, solo se añade sulfo-SBED y sirve como control para positivos falsos. Ambas suspensiones de células Neuro-2 se incubaron a 4 °C durante dos horas en un recipiente secundario usando un aparato agitador y, después, cada solución celular se distribuye en 13 partes alícuotas de 1,0 ml. Estas partes alícuotas se expusieron a radiación ultravioleta (365 nm) a 4 °C durante 15 minutos.

Las células se centrifugaron a 5,000 x g a 4 °C durante 15 minutos y se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada con Tris. Las células lavadas se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(□-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X[®] 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V) y los inhibidores de proteasa adecuados, con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos siliconizados nuevos y se añadieron perlas de avidina a los sobrenadantes eliminados. Esta mezcla se incubó a 4°C durante 3 horas. A continuación, las perlas de avidina se lavaron dos veces por centrifugación a 1000 x g a 4°C durante 10 min dando perlas de pellas, se decantó el sobrenadante, se añadieron 0,5 ml de tampón de lisis y se incubó la solución a 4 °C durante 10 minutos. Las perlas de avidina se lavaron después dos veces con 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Se añadieron aproximadamente 100 µl de tampón de carga SDS-PAGE a las perlas de avidina en forma de pellas y se hirvió durante 10 minutos. A continuación se sometieron 40 µl de una parte alícuota a electroforesis en gel de

poliacrilamida MOPS usando geles de poliacrilamida pretransformados con bis-Tris la 4-12 % NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en condiciones reductoras no desnaturizantes y desnaturizantes. La figura 10a muestra una proteína de aproximadamente 250 kDa en geles no reductores que representa la toxina PURE-A-SBED del reactivo de reticulación intacta unida al receptor de BoNT/A putativo. Las mismas muestras se procesaron en condiciones desnaturizantes y revelaron una proteína de aproximadamente 100 kDa que se purificó con PURE-A-SBED.

Para determinar la identidad del receptor de BoNT/A aislado a partir de los experimentos de reticulación se realizaron análisis de inmunotransferencia (Western) usando anticuerpos a la región citoplásmica del receptor FGF 1 (FGFR1), receptor FGF 2 (FGFR2), receptor FGF 3 (FGFR3) y receptor FGF 4 (FGFR4) de los polipéptidos. Aproximadamente 40 µl de partes alícuotas del complejo receptor-PureA, obtenido tal como se describe en el ejemplo II, 2, se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida MOPS usando geles de poliamida pretransformados con bis-Tris al 4-12 % NuPAGE® Novex (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en condiciones no reductoras y desnaturizantes reductoras. Los péptidos separados se transfirieron del gel a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) mediante inmunotransferencia (Western) usando un aparato celular de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Las membranas de PVDF se bloquearon incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución que contenía solución salina tamponada con tris 25 mM (ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol clorhídrico 25 mM (Tris-HCl)(pH 7,4), cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM), TWEEN-20® al 0,1 %, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, albúmina de suero bovino al 2 %, leche desnatada seca al 5 %. Las membranas bloqueadas se incubaron a 4 °C durante la noche en solución salina tamponada con Tris TWEEN-20® (solución salina tamponada con Tris 25 mM, TWEEN-20® al 0,1 %, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán) que contenía una de las soluciones de anticuerpos primarios siguientes: 1) una dilución 1:1000 de antisuero anti-FGFR1 policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos); 2) una dilución 1:1000 de antisuero anti-FGFR2 policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos); 3) una dilución 1:1000 de antisuero (C15) anti-FGFR3 policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos) o 4) una dilución 1:1000 de antisuero anti-FGFR4 policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Las manchas analizadas de anticuerpo primario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en solución salina tamponada con tris TWEEN-20®. Las membranas lavadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en solución salina tamponada con Tris TWEEN-20® que contenía bien una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anti-conejo policlonal de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) como anticuerpo secundario para las manchas FGFR1 y FGFR3 o bien una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anti-cabra policlonal de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) para las manchas FGFR2 y FGFR4. Las manchas analizadas de anticuerpo secundario se lavaron tres veces durante 15 minutos cada vez en solución salina tamponada con tris TWEEN-20®. La detección del producto de escisión de SNAP25₁₉₇ de BoNT/A se visualizó usando el sistema de detección mediante inmunotransferencia (Western) ECL Plus™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos) y se realizó una imagen de la membrana y el producto de escisión se cuantificó con un programa informático captador de imágenes en modo variable y de análisis del captador de imágenes Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos). La elección del tamaño en píxeles (100 a 200 píxeles) y los ajustes de voltaje PMT (350 a 600, normalmente 400) dependió de la mancha individual. Se detectó una banda en la muestra de receptor de toxina analizada con antisuero anti-FGFR3 de aproximadamente 97 kDa que es consecuente con el tamaño de FGFR3, lo que indica que FGFR3 es un receptor de BoNT/A (véase la figura 10b).

3. Identificación del receptor de BoNT/A de diversas células

Se analizaron varias líneas celulares que responden a la captación de BoNT/A con anticuerpos diseñados contra FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 con el fin de determinar que FGFR expresan estas líneas celulares. Además, se examinaron las células de la línea celular natural HIT-T15 que no responden a BoNT/A y la línea celular C7 aislada de HIT-T15 que responde a BoNT/A, tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 2c y 2d.

Para determinar la presencia de FGFR en líneas celulares que responden a la exposición a BoNT/A, las células se cultivaron, se recogieron y se lisaron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a,1b o 2c y se sometieron 40 µl de partes alícuotas al análisis de inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 2. Estos resultados indican que las líneas celulares sensibles a BoNT/A Neuro-2A, SH-SY5Y y HIT-T15-C7 expresan todas FGFR3, mientras que HIT-T15 natural no sensible a BoNT/A no lo hace (véase la figura 11). Los datos también revelaron que FGFR2 y FGFR4 no se detectaron en ninguna de las líneas celulares analizadas, mientras que FGFR1 se presentó en todas las líneas celulares analizadas, incluidas las células HIT-T15 naturales que no son sensibles a la exposición a BoNT/A (véase la figura 11).

4. Ensayos de competición competitiva

Para corroborar que la toxina BoNT/A penetra en células Neuro-2A a través del FGFR3 realizamos un experimento de competición con PURE-A y analizamos la respuesta de los productos analizados usando el ensayo de escisión

SNAP-25 tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1b. Si BoNT/A y un ligando de FGFR3 se unen al mismo receptor, entonces las cantidades aumentadas de ligando FGF deberían dar como resultado una respuesta reducida de una célula a la exposición de BoNT/A. No obstante, si BoNT/A y un ligando de FGFR3 se unen a receptores diferentes, entonces las cantidades aumentadas de ligando FGF no deberían dar como resultado ningún efecto sobre la respuesta de una célula a la exposición de BoNT/A. La tabla 1, que los solicitantes no reivindican es una tabulación completa de receptores y especies de FGF, muestra determinados miembros de la familia de FGFR y sus ligandos conocidos y distribución en tejidos.

Para determinar si ligandos para FGFR3 pueden competir competitivamente con BoNT/A para unirse a FGFR3, se plaquearon aproximadamente 5×10^5 células Neuro-2A en pocillos individuales de placas de cultivo hístico de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina que contenían 3 ml de EMEM, suplementado con glutamina 2 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5 g/l de bicarbonato de sodio y 1 x solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzaron confluencia. Se añadió PURE-A aproximadamente 5 nM (Metabio, Inc., Madison, WI, Estados Unidos) junto con FGF1, FGF2 o tanto FGF1 como FGF2 a distintas concentraciones (0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 50 nM, 200 nM) al medio de cultivo que contenía las células y se incubó durante aproximadamente 10 minutos a 37 °C. Las células se recogieron en tubos de 15 ml, se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y después se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Las células se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(K-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X[®] 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V), con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos siliconizados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior.

La presencia de un producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A se determinó mediante análisis de inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 1a, con la excepción de que las membranas PVDF bloqueadas se incubaron en un solución de anticuerpo primario que contenía una dilución 1:50.000 de anticuerpo anti-SNAP-25 monoclonal de ratón (SMI-81; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, Estados Unidos) mejor que el antisuerpo anti-SNAP25 policlonal de conejo pAb anti-SNAP25¹⁹⁷ N° 1 y una solución de anticuerpo secundario que contenía una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anti-ratón policlonal de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos) mejor que el anticuerpo IgG-HRP anti-conejo policlonal de cabra con el fin de detectar tanto el sustrato de SNAP-25 y el producto de escisión de SNAP25¹⁹⁷ de BoNT/A. Una cantidad aumentada de ligandos de FGF indicó que estos FGF1 y FGF2 compiten por el mismo receptor que BoNT/A y se confirmó posteriormente que FGFR3 es un receptor de BoNT/A (véase la figura 12).

Ejemplo III

Una proteína de fusión que comprende la porción C teminal de la cadena pesada de BoNT/A y la cadena ligera de BoNT/E se analiza para evaluar su capacidad de unirse selectivamente a células susceptibles de ser intoxicadas con BoNT/A. Se incubó una preparación que comprende diluciones de la proteína de fusión con células de insulinita HIT-T15 que expresan FGFR3 exógeno en presencia de gangliósido GT1b. La capacidad del péptido de fusión para unirse a y penetrar en las células de insulinita se detecta detectando la secreción de insulina en respuesta a la presencia de glucosa, tal como se ha descrito en el ejemplo I, 1a. Por el contrario, la secreción de insulina no afecta a células que expresan FGFR3.

Los resultados de este ensayo muestran que la cantidad de insulina segregada en el medio de cultivo es decreciente de una modo dependiente de la dosis cuando la proteína de fusión se agrega al medio de cultivo. Los análisis de inmunotransferencia (Western) de lisados celulares mostrarán la conversión de SNAP-25 de longitud completa en la forma escindida típica de la actividad proteolítica de la proteasa de cadena ligera de BoNT/E. Este ensayo, por lo tanto, es útil para mostrar que el péptido de fusión es capaz de unirse a y de penetrar en células susceptibles a BoNT/A.

La misma proteína de fusión es capaz de intoxicar células de la unión neuromuscular.

Ejemplo IV

Una proteína de fusión que comprende una porción de unión al receptor de una especie de FGF capaz de unirse a FGFR3 (que incluye FGF1, FGF2, FGF4 y FGF9) y el dominio de translocación y la cadena ligera de BoNT/E se analiza para evaluar su capacidad de unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A. El ensayo se realiza tal como se ha descrito en el ejemplo 1 anteriormente, con resultados similares; los fragmentos de SNAP-25 escindidos detectados son característicos de intoxicación con BoNT/A.

Ejemplo V

La BoNT/A producida a partir de la fermentación de *Clostridium botulinum* se produce usando técnicas de fermentación estándar. Tanto la preparación en masa como las versiones formuladas purificadas de toxina expresada, o ambas, se analizan para evaluar la pureza y la actividad tal como sigue. Se incubaba una preparación que comprende diluciones de la preparación de BoNT/A con células de insulinooma HIT-T15 que expresan FGFR3 exógeno en presencia de gangliósido GT1b. La capacidad de la toxina para unirse a y penetrar en las células de insulinooma se detecta detectando la secreción de insulina en respuesta a la presencia de glucosa, tal como se ha descrito en el ejemplo I, 1a. La actividad específica de la preparación puede calcularse a partir de la concentración de una proteína determinada y la actividad de la preparación a diversas dosis.

Estos datos se comunican a la Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) por una compañía farmacéutica como parte de datos que demuestran como se fabrica y se analiza la BoNT/A. Esta información es considerada por la FDA, que decide permitir la fabricación y venta de este lote de BoNT/A y lotes subsiguientes fabricados y analizados de forma similar, como producto farmacéutico terapéutico basado en parte en estos datos de ensayo del producto bruto y/o la formulación.

El producto farmacéutico que comprende la BoNT/A se ofrece a continuación para su venta como medicación con prescripción médica.

Ejemplo VI

Lo mismo que en el ejemplo V, pero el polipéptido producido es la neurotoxina de fusión del ejemplo III, producida en *E. coli*. Los lotes del producto bruto y/o de formulación de la neurotoxina de fusión se analizan tal como se ha indicado anteriormente, los datos se comunican a la FDA, y la decisión de aprobar la comercialización o la venta continuada de dicho polipéptido de fusión como agente terapéutico se realiza por parte de la FDA sobre la base, al menos en parte, de dichos datos. La compañía farmacéutica ofrece entonces la neurotoxina de fusión para su venta como agente terapéutico con prescripción médica.

Ejemplo VII

Se realiza un ensayo *in vitro* usando FGFR3 clonado unido a un soporte sólido en presencia de gangliósido GT1b. El FGFR3 unido se satura primeramente con cadena pesada de BoNT/A (cadena H) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lava exento de FGF no unido. Un compuesto de ensayo a partir de una biblioteca combinatoria de compuestos se pone en contacto con el receptor en condiciones sustancialmente fisiológicas (por ejemplo, PBS) y el eluido se recoge. La concentración de cadena H en el eluido se compara con la concentración de cadena H de un eluido control en el que la cadena H no se unió primeramente a FGFR3.

Los compuestos de ensayo que son capaces de unirse fuertemente a FGFR3 y compiten con la cadena H por unirse a FGFR3 (por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en esta sección) son compuestos candidatos para el desarrollo de un antídoto para la intoxicación por botulismo agudo.

Ejemplo VIII

Generación de células que contienen FGFR3 de forma estable

1. Construcción de pQBI25/FGFR3

Para construir pQBI-25/FGFR3, un fragmento de ácido nucleico que codifica la región de aminoácidos que comprende FGFR3 de SEC ID N°: 4 se amplifica a partir de una biblioteca de ADNc cerebral humano usando un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa y se subclona dando un vector pCR2.1 usando el procedimiento de clonación TOPO® TA (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Los cebadores de oligonucleótidos directo e inverso que se usan para esta reacción se diseñan para que incluyan sitios de enzima de restricción únicos útiles para las etapas de subclonación subsiguientes. El constructo pCR2.1/FGFR3 resultante se digiere con enzimas de restricción que 1) causan la escisión del inserto que contiene el marco de lectura abierto completo que codifica el FGFR3 y 2) posibilita que este inserto se una operativamente a un vector pQBI-25 (Qbiogene, Inc., Irvine, CA, Estados Unidos). Este inserto se subclona usando un procedimiento de ADN ligasa T4 dando un vector pQBI-25 que se digiere con las endonucleasas de restricción apropiadas para proporcionar pQBI-25/FGFR3. La mezcla de ligación se transforma en células de *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) usando un procedimiento de choque térmico, se plaquea en placas de agar al 1,5 % Luria-Bertani (pH 7,0) que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y se sitúan en una incubadora a 37 °C para su cultivo durante la noche. Las bacterias que contienen constructos de expresión se identifican como colonias resistentes a ampicilina. Los constructos candidatos se aíslan usando un procedimiento de minipreparación de plásmido de lisis alcalino y se analizan mediante cartografiado de digestión de endonucleasa de restricción para determinar la presencia y orientación del inserto. Esta estrategia de clonación proporciona un constructo de expresión de mamífero que codifica el FGFR3 de SEC ID N°: 4 unido operativamente a los elementos de expresión del vector pQBI-25.

2. Células transformadas de forma estable usando un procedimiento de cruce recombinante

Para generar una línea celular integrada de forma estable que exprese un FGFR3 usando un procedimiento de cruce, se plaquea una densidad adecuada (1×10^5 a 1×10^5 células) de células apropiadas, tales como, por ejemplo, HIT-T15 o Neuro2A, en una placa de cultivo místico de 35 mm que contiene 3 ml de medio de cultivo completo suplementado y se cultivan en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzan una densidad apropiada para la transfección. Se prepara una solución de transfección de 500 µl añadiendo 250 µl de medio en suero reducido OPTI-MEM que contiene 15 µl de LipofectAmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos a 250 µl de medio en suero reducido OPTI-MEM que contiene 5 µg de constructo de expresión que codifica un FGFR3, tal como, por ejemplo pQBI-25/FGFR3 (véase el ejemplo VIII, 1). Esta transfección se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. El medio completo suplementado se reemplaza por 2 ml de medio de suero reducido OPTI-MEM y los 500 µl de solución de transfección se añaden a las células y las células se incuban en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 16 horas. El medio de transfección se reemplaza por 3 ml de medio de cultivo completo suplementado nuevo y las células se incuban en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 48 horas. El medio se reemplaza por 3 ml de medio de cultivo completo suplementado nuevo que contiene aproximadamente 5 µg/ml de G418. Las células se incuban en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 4 semanas, reemplazándose el medio viejo por medio selectivo de G418 completo, suplementado, nuevo cada 4 a 5 días. Una vez establecidas las colonias resistentes a G418, los clones resistentes se vuelven a plaquear en placas de cultivo de 35 mm nuevas que contienen medio de cultivo completo nuevo, suplementado con aproximadamente 5 µg/ml de G418 hasta que estas células alcanzan una densidad de 6 a 20×10^5 células/ml.

Para analizar la expresión de un FGFR3 a partir de líneas celulares aisladas que integraron de forma estable un constructo de expresión que codifica un FGFR3, tales como, por ejemplo, pQBI-25/FGFR3 (véase el ejemplo VIII, 1), aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células de cada línea celular se plaquean en una placa de cultivo hístico de 35 mm que contiene 3 ml de DMEM selectivo de G418 completo suplementado y se cultivan en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzan una densidad de aproximadamente 5×10^5 células/ml (6-16 horas). El medio se reemplazó con 3 ml de medio de cultivo selectivo de G418 completo suplementado y las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 %. Después de 48 horas, las células se recogen enjuagando las células una vez con 3,0 ml de solución salina tamponada con fosfato 100 mM, pH 7,4, y se lisan con un tampón que contiene ácido 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol clorhídrico (Tris-HCl) 62,6 mM, pH 6,8, y lauril sulfato de sodio 2 % (SDS). Las células lisadas se centrifugan a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y los sobrenadantes se transfieren a tubos siliconados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior.

Para detectar la presencia de un FGFR3, las muestras se separan mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) MOPS y se analizan mediante procedimientos de inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 2 usando una dilución 1:1000 de antisuero (C15) anti-FGFR3 policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos), con el fin de identificar líneas celulares que han integrado de forma estable y expresan el sustrato de FGFR3.

Ejemplo IX

Estudios de fosforilación de FGFR3

1. Fosforilación de FGFR-3 expuesto a FGF o BoNT/A

Cuando se unen a ligandos específicos, los FGFR se autofosforilan sobre residuos de tirosina específicos. Esto comienza el proceso de internalización del receptor y del ligando en la ruta endosómica. Si BoNT/A se une a FGFR3, entonces la exposición a BoNT/A debería provocar la autofosforilación de FGFR3 en células expuestas.

Para determinar si la unión de BoNT/A daba como resultado la fosforilación de FGFR3, se plaquearon aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células Neuro-2A en placas de cultivo hístico de 6 pocillos recubiertas con poli-D-lisina/laminina que contenían 3 ml de EMEM exento de suero, suplementado con piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 1,5 g/l de bicarbonato de sodio y 1x solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se cultivaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % hasta que las células alcanzaron una densidad de 5×10^5 células/ml. El medio exento de suero se reemplazó por EMEM suplementado nuevo que contenía FBS al 1 % (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y bien FGF-2 5 nM (Biosource International, Camarillo, CA, Estados Unidos) o una concentración 5 nM de PURE/A (Metabio, Inc., Madison, WI, Estados Unidos). A continuación, las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante 5 min, 10 min, 20 min y 30 min, con células no expuestas usadas como tiempo 0. Las células se recogieron en tubos de 15 ml, se lavaron una vez con 1 ml de

solución salina tamponada con fosfatos, pH 7,4, y a continuación se transfirieron a tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Las células se lisaron en 0,5 ml de tampón de lisis que contenía N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES) 50 mM, pH 6,8, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 1,5 mM, ácido etilenglicol bis(□-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 1 mM, glicerina al 10 % y Triton-X® 100 (polietoxilato de 4-octilfenol) al 1 % (V/V), con rotación durante 1 hora a 4 °C. Las células lisadas se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar desechos y el sobrenadante se transfirió a tubos siliconizados nuevos. Las concentraciones de proteínas se midieron usando el procedimiento de Bradford y se resuspendieron en 1 x tampón de muestra SDS a 1 mg/ml o una concentración superior.

El sobrenadante que contenía 100 µg de proteína se inmunoprecipitó usando 5 µg de anticuerpo anti-fosfotirosina unido a una perla de sefarosa (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos). El producto inmunoprecipitado se sometió a un análisis de inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 4, siendo analizadas las manchas para evaluar FGFR3 (Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Estos experimentos muestran que el FGFR3 se fosforila después de su exposición a FGF2 o a BoNT/A, lo que indica que BoNT/A se une a FGFR3 (véase la figura 13a).

2. Inhibición con DMBI de la fosforilación de FGFR-3 expuesto a FGF

Para determinar si el DMBI inhibe la fosforilación inducida por BoNT/A de FGFR3, se plaquearon células Neuro-2A y se cultivaron tal como se describe en el ejemplo IX, 1. Las células Neuro-2A se plaquaron a una densidad de 5×10^5 células/pocillo (placa de 6 pocillos) y se incubaron durante la noche en medio exento de suero. El medio se reemplazó por EMEM suplementado exento de suero nuevo que contenía concentraciones 0, 1 µM, 5 µM, 20 µM o 100 µM de DMBI (EMD Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 1 hora. El DMBI inhibe la autofosforilación y la dimerización de receptores de tipo FGFR y PDGF. Las células se lavaron después y se dispusieron en EMEM suplementado nuevo que contenía FBS al 1 % (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y FGF-2 5 nM (Biosource International, Camarillo, CA, Estados Unidos). A continuación, las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 5 min, 10 min y se recogieron y se inmunoprecipitaron tal como se ha descrito anteriormente en ejemplo IX, 1. Los productos inmunoprecipitados se sometieron a un análisis de inmunotransferencia (Western) tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II, 4, con la excepción de que las manchas se analizaron con una solución de anticuerpo primario que contenía una dilución 1:1000 de un antisuero anti-fosfotirosina policlonal de conejo (Upstate USA, Inc., Charlottesville, VA, Estados Unidos) y una solución de anticuerpo secundario que contenía una dilución 1:20.000 de anticuerpo de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina G (IgG, H+L) anticonejo policlonal de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP; Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, Estados Unidos). Estos resultados indican que el DMBI inhibe eficazmente la fosforilación de FGFR3 después de exposición a FGF2 (véase la figura 13b).

3. Inhibición con DMBI de la actividad de BoNT/A

Para determinar si el DMBI puede inhibir la actividad de BoNT/A, se plaquearon células Neuro-2A y se cultivaron tal como se describe en el ejemplo IX, 1. El medio se reemplazó por EMEM suplementado exento de suero nuevo que contenía concentraciones 0,1 µM, 5 µM, 20 µM o 100 µM de DMBI (EMD Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 1 hora. El DMBI inhibe la autofosforilación y la dimerización de receptores de tipo FGFR y PDGF. Las células se lavaron después y se dispusieron en EMEM suplementado nuevo que contenía FBS al 1 % (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y PURE/A 5 nM (Metabiolabs, Inc., Madison, WI, Estados Unidos). A continuación, las células se incubaron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 5 % durante aproximadamente 5 min, 10 min y se recogieron tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo IX, 1. Se analizaron partes alícuotas para evaluar la presencia de producto de escisión de SNAP-25¹⁹⁷ de BoNT/A usando el ensayo de escisión de SNAP-25 tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo I, 1b. Estos resultados indican una reducción en la cantidad de producto de escisión de SNAP-25 presente, indicando de este modo que el DMBI inhibe eficazmente la actividad de BoNT/A y confirmando que esta toxina se internaliza por medio de FGFR3 (véase la figura 13c).

Los ejemplos proporcionados en el presente documento son simplemente ilustraciones de diversos aspectos de la invención, que debe entenderse que se define sólo mediante las reivindicaciones que siguen a la presente memoria descriptiva.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fernandez-Salas, Ester

Garay, Patton

Aoki, Kei Roger

5 <120> Ensayo de selección de toxinas botulínicas

<130> 17596 (BOT)

<150> US 60/547.591

<151> 24/02/2004

<160>32

10 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210>1

<211> 2427

<212> DNA

<213> Homo sapiens FGFR3IIIB

15 <400> 1

```

atggggcgccc ctgcctgcgc cctcgcgctc tgcgtggcgc tggccatcgt ggccggcgcc 60
tcctcggagt ccttggggac ggagcagcgc gtcgtggggc gagcggcaga agtcccgggc 120
ccagagcccc gccagcagga gcagtgggtc ttcggcagcg gggatgctgt ggagctgagc 180
tgtcccccg ccgggggtgg tcccatgggg ccactgtct gggtaagga tggcacagg 240
ctgggtgccct cggagcgtgt cctgggtggg cccagcggc tgcaggtgct gaatgcctcc 300
cacgaggact ccggggccta cagctgccgg cagcggctca cgcagcgcgt actgtgccac 360
ttcagtgtgc ggggtgacaga cgctccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag 420
gctgaggaca caggtgtgga cacaggggcc cttactgga cacggccga gcggatggac 480
aagaagctgc tggcctgccc ggccgccaac accgtccgct tccgctgccc agccgctggc 540
aaccaccact cctccatctc ctggctgaag aacggcaggg agttccgcgg cgagcaccgc 600
attggaggca tcaagctgcg gcatcagcag tggagcctgg tcatggaaag cgtggtgccc 660
tcggaccgcg gcaactacac ctgcgtcgtg gagaacaagt ttggcagcat ccggcagacg 720
tacacgtgg acgtgctgga gcgctcccc caccggccca tcctgcaggc ggggctgccc 780
gccaaccaga cggcggtgct gggcagcgac gtggagttcc actgcaaggt gtacagtgc 840
gcacagcccc acatccagt gctcaagcac gtggaggtga acggcagcaa ggtgggccc 900
gacggcacac cctacgttac cgtgctcaag tcctggatca gtgagagtgt ggaggccgac 960
gtgcgcctcc gcctggccaa tgtgtcggag cgggacgggg gcgagtacct ctgtcgagcc
1020
accaatttca taggcgtggc cgagaaggcc ttttggctga gcgttcacgg gccccagca
1080
gccgaggagg agctgggtga ggctgacgag gcgggcagtg tgtatgcagg catcctcagc
1140
tacgggggtg gcttcttctc gttcctcctg gtgggtggcg ctgtgacgct ctgccgcctg
1200
cgagccccc ccaagaaagg cctgggctcc cccaccgtgc acaagatctc ccgcttccc
1260
ctcaagcgac aggtgtccct ggagtccaac gcgtccatga gctccaacac accactgggt
1320
cgcatcgcaa ggctgtcctc aggggagggc cccacgctgg ccaatgtctc cgagctcgag
1380
ctgcctgccc accccaaatg ggagctgtct cgggcccggc tgaccctggg caagcccctt
1440

```

ggggagggct gcttcggcca ggtgggtcatg gcggaggcca tcggcattga caaggaccgg
 1500
 gccgccaagc ctgtcacctg agccgtgaag atgctgaaag acgatgccac tgacaaggac
 1560
 ctgtcggacc tgggtgtctga gatggagatg atgaagatga tcgggaaaca caaaaacatc
 1620
 atcaacctgc tggg'gcctg cacgcagggc gggcccctgt acgtgctggt ggagtacgcg
 1680
 gccaagggta acctgcggga gtttctgcgg gcgcggcgcc ccccgggcct ggactactcc
 1740
 ttcgacacct gcaagccgcc cgaggagcag ctcaccttca aggacctggt gtctgtgtgc
 1800
 taccaggtgg cccggggcat ggagtacttg gcctcccaga agtgcattca caggggacctg
 1860
 gctgcccga atgtgctggt gaccgaggac aacgtgatga agatcgaga cttcgggctg
 1920
 gcccgggacg tgcacaacct cgactactac aagaagacaa ccaacggccg gctgcccgtg
 1980
 aagtggatgg cgctgaggc cttgtttgac cgagtctaca ctcaccagag tgacgtctgg
 2040
 tcctttgggg tcctgtcttg ggagatcttc acgtgggggg gctccccgta ccccgccatc
 2100
 cctgtggagg agctcttcaa gctgctgaag gagggccacc gcatggacaa gcccgccaac
 2160
 tgcacacacg acctgtacat gatcatgcgg gagtgctggc atgccgcgcc ctcccagagg
 2220
 cccaccttca agcagctggt ggaggacctg gaccgtgtcc ttaccgtgac gtccaccgac
 2280
 gagtacctgg acctgtcggc gcctttcgag cagtactccc cgggtggcca ggacaccccc
 2340
 agtccagct cctcagggga cgactccgtg tttgcccacg acctgctgcc cccggcccca
 2400
 cccagcagtg ggggctcgcg gacgtga
 2427

<210>2

<211> 808

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens FGFR3IIIb

<400> 2

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

		115					120				125				
Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Asp	Thr
	130					135					140				
Gly	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Arg	Pro	Glu	Arg	Met	Asp
145					150					155					160
Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys
				165					170					175	
Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly
			180					185					190		
Arg	Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His
		195					200					205			
Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly
	210					215					220				
Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr
225					230					235					240
Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln
				245					250					255	
Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu
			260					265					270		
Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu
		275					280					285			
Lys	His	Val	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro
	290					295					300				
Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Lys	Ser	Trp	Ile	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Ala	Asp
305					310					315					320
Val	Arg	Leu	Arg	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Gly	Gly	Glu	Tyr
				325					330					335	
Leu	Cys	Arg	Ala	Thr	Asn	Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Phe	Trp
			340					345					350		
Leu	Ser	Val	His	Gly	Pro	Arg	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Ala
		355					360					365			
Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Gly	Ile	Leu	Ser	Tyr	Gly	Val	Gly
	370					375					380				
Phe	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Cys	Arg	Leu
385					390					395					400
Arg	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Ser	Pro	Thr	Val	His	Lys	Ile
				405					410					415	
Ser	Arg	Phe	Pro	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Asn	Ala	Ser
			420					425					430		
Met	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly
		435					440					445			
Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp
	450					455					460				
Pro	Lys	Trp	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu
465															

[illegible] $\langle 210 \rangle_3$

<211> 2421

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens FGFR3IIc

$\langle 400 \rangle$ 3

atgggcgccc	ctgcctgcgc	cctcgcgctc	tgcgtggccg	tggccatcgt	ggccggcgcc	60
tctctcggagt	ccttggggac	ggagcagcgc	gtcgtggggc	gagcggcaga	agtcccgggc	120
ccagagcccg	gccagcagga	gcagttggtc	ttcggcagcg	gggatgctgt	ggagctgagc	180
tgtcccccg	ccgggggtgg	tcccatgggg	cccactgtct	gggtcaagga	tggcacaggg	240
ctggtgccct	cggagcgtgt	cctggtgggg	ccccagcggc	tgcaggtgct	gaatgcctcc	300
cacgaggact	ccggggccta	cagctgccgg	cagcggctca	cgcagcgcgt	actgtgccac	360
ttcagtgctgc	gggtgacaga	cgctccatcc	tcggagatg	acgaagacgg	ggaggacgag	420
gctgaggaca	caggtgtgga	cacaggggcc	ccttactgga	cacggcccga	cgggatggac	480
aagaagctgc	tggcctgtgc	ggccgccaac	accgtccgct	tccgctgccc	agccgctggc	540
aaccccactc	cctccatctc	ctggctgaag	aacggcaggg	agttccgcgg	cgagcaccgc	600
attggaggca	tcaagctgcg	gcatcagcag	tggagcctgg	tcatggaaag	cgtggtgccc	660
tcggaccgcg	gcaactacac	ctgcgtcgtg	gagaacaagt	ttggcagcat	ccggcagacg	720
taacagctgg	acgtgcttga	gcgctccccg	caccggccca	tcttcgagge	ggggctgccc	780
gccaaccaga	cggcgctgtg	gggcagcagc	gtggagtccc	actgcaaggt	gtacagtgac	840
gcacagcccc	acatccagtg	gtcgaagcac	gtggagtgta	acggcagcaa	ggtagggccc	900
gacggcacac	cctacgttac	cgtgctcaag	acggcggcgg	ctaaccaccac	gcacaaggag	960

ctagagggttc tctccttgca caacgtcacc tttgaggacg ccggggagta cacctgcctg
 1020
 gcgggcaatt ctattgggtt ttctcatcac tctgcgtggc tgggtggtgct gccagccgag
 1080
 gaggagctgg tggaggctga cgaggcgggc agtgtgtatg caggcatcct cagctacggg
 1140
 gtgggcttct tcctgttcat cctgggtggtg gcggctgtga cgctctgccg cctgcgcagc
 1200
 ccccccaaga aaggcctggg ctccccacc gtgcacaaga tctcccgctt cccgctcaag
 1260
 cgacagggtg ccctggagtc caacgcgtcc atgagctcca acacaccact ggtgcgcac
 1320
 gcaaggctgt cctcagggga gggccccacg ctggccaatg tctccgagct cgagctgcct
 1380
 gccgacccca aatgggagct gtctcgggcc cggctgaccc tgggcaagcc ccttggggag
 1440
 ggctgcttcg gccagggtgt catggcggag gccatcggca ttgacaagga ccgggccgcc
 1500
 aagcctgtca ccgtagccgt gaagatgctg aaagacgatg ccactgacaa ggacctgtcg
 1560
 gacctggtgt ctgagatgga gatgatgaag atgatcggga aacacaaaaa catcatcaac
 1620
 ctgctgggcg cctgcacgca gggcgggccc ctgtacgtgc tgggtggagta cgcgccaag
 1680
 ggtaacctgc gggagtttct gcgggcgcgg cggcccccg gcttgacta ctccttcgac
 1740
 acctgcaagc cgcccagga gcagctcacc ttcaaggacc tgggtgtcctg tgcctaccag
 1800
 gtggcccggg gcatggagta cttggcctcc cagaagtga tccacagga cctggctgcc
 1860
 cgcaatgtgc tgggtgaccga ggacaacgtg atgaagatcg cagacttcgg gctggcccgg
 1920
 gacgtgcaca acctcgacta ctacaagaag acaaccaacg gccggctgcc cgtgaagtgg
 1980
 atggcgctg aggccttgtt tgaccgagtc tacactcacc agagtgcctg ctggtccttt
 2040
 ggggtcctgc tctgggagat cttcacgtg gggggctccc cgtaccccg catcctgtg
 2100
 gaggagctct tcaagctgct gaaggagggc caccgcatgg acaagccgc caactgcaca
 2160
 cagacactgt acatgatcat gcgggagtg tggcatgccg cgccctcca gagggccacc
 2220
 ttcaagcagc tgggtggagga cctggaccgt gtccttaccg tgacgtccac cgacgagtac
 2280
 ctggacactg cggcgcttt cgagcagtac tccccgggtg gccaggacac cccagctcc
 2340
 agctcctcag gggacgactc cgtgtttgcc cagcactgc tgccccggc cccaccagc
 2400
 agtgggggct cgcggacgtg a
 2421

<210>4

<211> 806

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens FGFR3IIIc

<400>4

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

Pro	Thr	Leu	Ala	Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Pro	Lys
	450					455					460				
Trp	Glu	Leu	Ser	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu
465					470					475					480
Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys
				485					490					495	
Asp	Arg	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp
			500					505					510		
Asp	Ala	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met
		515					520					525			
Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala
	530					535					540				
Cys	Thr	Gln	Gly	Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys
545					550					555					560
Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Leu	Asp
				565					570					575	
Tyr	Ser	Phe	Asp	Thr	Cys	Lys	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Phe	Lys
			580					585					590		
Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu
		595					600					605			
Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu
	610					615					620				
Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg
625					630					635					640
Asp	Val	His	Asn	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu
				645					650					655	
Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr
			660					665					670		
His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe
		675					680					685			
Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe
	690					695					700				
Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr
705					710					715					720
His	Asp	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Ala	Pro	Ser
				725					730					735	
Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Val	Leu
			740					745					750		
Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Pro	Phe	Glu
		755				760						765			
Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly
	770					775					780				
Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ala	His	Asp	Leu	Leu	Pro	Pro				

 $\langle 210 \rangle_5$

<211> 2085

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens FGFR3IIS

<400> 5

atggggcgccc ctgcctgcgc cctcgcgcctc tqcgtggccg tggccatcgt ggccggcgcc 60

tcctcggagt ccttgggggac ggagcagcgc gtcgtggggc gagcggcaga agtcccgggc 120
 ccagagcccc gccagcagga gcagttgggtc ttcggcagcg gggatgctgt ggagctgagc 180
 tgtcccccgc ccgggggtgg tcccatgggg cccactgtct gggtaagga tggcacaggg 240
 ctgggtgccct cggagcgtgt cctgggtggg cccagcggc tgcaggtgct gaatgcctcc 300
 cacgaggact ccggggccta cagctgccgg cagcggctca cgcagcgcgt actgtgccac 360
 ttcagtgtgc ggggtgacaga cgctccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag 420
 gctgaggaca caggtgtgga cacaggggcc ccttactgga cacggcccga gcgatggac 480
 aagaagctgc tggccgtgcc ggccgccaac accgtccgct tccgctgcc agccgctggc 540
 aacccactc cctccatctc ctggctgaag aacggcagg agttccgagg cgagcaccgc 600
 attggaggca tcaagctgcg gcatcagcag tggagcctgg tcatggaaag cgtgggtgcc 660
 tcggaccgcg gcaactacac ctgcgtcgtg gagaacaagt ttggcagcat ccggcagacg 720
 tacacgtgg acgtgctgga gcgtccccc caccggccca tcctgcaggc ggggctgccg 780
 gccaacaga cggcggtgct gggcagcgac gtggagttcc actgcaaggt gtacagtac 840
 gcacagcccc acatccagt gctcaagcac gtggaggtga acggcagcaa ggtgggccc 900
 gacggcacac cctacgttac cgtgctcaag gtgtccctgg agtccaacgc gtccatgagc 960
 tccaacacac cactggtgcg catcgcaagg ctgtcctcag gggagggccc cacgctggcc
 1020
 aatgtctccg agctcgagct gcctgccgac cccaaatggg agctgtctcg ggcccggctg
 1080
 accctgggca agccccttgg ggagggctgc ttcggccagg tggatcatggc ggaggccatc
 1140
 ggcattgaca aggaccgggc cgccaagcct gtcaccgtag ccgtgaagat gctgaaagac
 1200
 gatgccactg acaaggacct gtcggacctg gtgtctgaga tggagatgat gaagatgatc
 1260
 gggaaacaca aaaacatcat caacctgctg ggcgcctgca cgcagggcgg gccctgtac
 1320
 gtgctggtgg agtacgcggc caagggtaac ctgcgggagt ttctgcgggc gcggcgcccc
 1380
 ccgggcctgg actactcctt cgacacctgc aagccgcccg aggagcagct caccttcaag
 1440
 gacctggtgt cctgtgccta ccaggtggcc cggggcatgg agtacttggc ctcccagaag
 1500
 tgcattcaca gggacctggc tgcccgaat gtgctggtga ccgaggacaa cgtgatgaag
 1560
 atcgagact tcgggctggc ccgggacgtg cacaacctcg actactacaa gaagacaacc
 1620
 aacggccggc tgcccgtgaa gtggatggcg cctgaggcct tgtttgaccg agtctacact
 1680
 caccagatg acgtctggtc ctttggggtc ctgctctggg agatcttcac gctggggggc
 1740
 tccccgtacc ccggcatccc tgtggaggag ctcttcaagc tgctgaagga gggccaccgc
 1800
 atggacaagc ccgccaactg cacacacgac ctgtacatga tcatgcggga gtgctggcat
 1860
 gccgcgccct ccagaggcc caccttcaag cagctggtgg aggacctgga ccgtgtcctt
 1920
 accgtgacgt ccaccgacga gtacctggac ctgtcggcgc ctttcgagca gtactccccg
 1980
 ggtggccagg acacccccag ctccagctcc tcaggggacg actccgtgtt tgcccacgac
 2040
 ctgctgcccc cggccccacc cagcagtggg ggctcgcgga cgtga
 2085

<210>6

<211> 694

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens FGFR3IIIS

<400> 6

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

Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
420 425 430
Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
435 440 445
Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
450 455 460
Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
465 470 475 480
Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
485 490 495
Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
500 505 510
Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
515 520 525
Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
530 535 540
Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
545 550 555 560
His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
565 570 575
Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
580 585 590
Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
595 600 605
His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
610 615 620
Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
625 630 635 640
Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
645 650 655
Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
660 665 670
Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
675 680 685
Ser Gly Gly Ser Arg Thr
690

<210>7

<211> 2409

<212> ADN

5 <213> Bos taurus FGFR3IIc

<400> 7

atggggcgccc cggctcgcgc cctcgcgttt tgcgtggcag tggcgggtcat gaccggcgcc 60
gccctcgggt ccccgggcgt ggagccccgc gtcgcgcgga gagcggcaga ggtcccgggc 120
cccgagccca gcccgagga gcgggccttt ggcagcgggg acaccgtgga gctgagctgc 180
cgcttgccgg cgggggtgcc cacagagccc accgtctggg tgaaggacgg cgtgggcctg 240
gcgcctcgg accgcgtcct ggtggggccg cagecggtac aggtgctcaa cgcctccac 300
gaggacgccg gaggctacag ctgccgccag cgcctctccc agcggctgct gtgcctcttc 360
agcgtgcgcg tgacagatgc tccgtcctca ggggatgacg aggggtggga cgacgaggcc 420
gaggacacag ctggggcccc ttactggacg cggcctgagc ggatggacaa gaagctgcta 480
gcgggtgccgg ccgccaacac ggttcgcttc cgctgccag ctgctggcaa cccacgcca 540
tccatcacct ggctgaagaa cggcaaggag ttccggggcg agcacgcac cgggggaatc 600
aaactgcggc agcagcagtg gagcctggtc atggagagcg tgggtgccctc ggaccgcggc 660
aactacacgt gcgtcgtgga gaacaagtcc ggcagaatcc agcagaccta caccctggac 720

gtgctggagc gctctccgca ccggcccatc ctacaggccg ggctgcccgc taaccagaca 780
 gccgtgctgg gcagcgatgt ggagttccac tgcaaggtct acagcgacgc ccagccccac 840
 atccagtggc tcaagcacgt ggaggtgaac ggcagcaagg tggggcccga cggcacgccc 900
 tacgtcaccg tgctcaagac ggcgggcgct aacaccaccg acaaggagct agaggttcta 960
 tccttgcgca atgtcacctt tgaggacgcg ggggagtaca catgtctggc gggcaattct
 1020
 atcgggtttt cccatcactc tgcgtggctg gtggtgctgc cagctgagga ggagctgggtg
 1080
 gaagccggtg aggctggcgg tgtgttcgcg ggtgtcctca gctacgggct gggcttcctc
 1140
 ctcttcatcc tggccgtggc cgccgttacg ctctaccgcc tgaggagccc ccctaagaag
 1200
 ggcttgggct cggccgcggt gcacaaggtc tcccgttcc cgtcaagcg acaggtgtcc
 1260
 ttggagtcca gctcatccat gagctccaac acaccgctgg tacgcattgc cggctgtca
 1320
 tcgggcgagg gccccaccct ggccaacgtc tctgagctcg agctgcccgc cgacccaag
 1380
 tgggagctgt cccggggccc gctgaccctg ggcaagcctc ttggggaggg ctgcttcggc
 1440
 caggtggtca tggcagaggc cattggcatc gacaaggacc gagctgcaa gcctgtcacg
 1500
 gtggccgtga agatgctgaa agatgacgcc acggataagg acttatcgga cctggtgtcc
 1560
 gagatggaga tgatgaagat gatcgaaaa cacaagaaca ttatcaacct gctaggcgcc
 1620
 tgcacgcagg gcggggcccct gtacgtgctg gtggagtacg cggccaaggg caacctgcgg
 1680
 gaatacctgc gggcacggcg gccccgggc actgactact ccttcgacac ctgccggctg
 1740
 cccgaggagc agctcacctt caaagacctg gtgtcctgcg cctaccaggt ggcgcggggc
 1800
 atggagtacc tggcctcgca gaagtgcac cacagggacc tggcgggccc caacgtgctg
 1860
 gtgactgagg acaacgtgat gaaaatcgcc gacttcggcc tggctcgtga cgtgcacaac
 1920
 ctcgactact acaaaaagac caaaaacggc cgcttggccc tgaagtggat ggcacccgag
 1980
 gccttgtttg accgcgtcta caccaccaa agtgacgtct ggtccttcgg ggtcctgctc
 2040
 tgggagatct tcacgctggg gggctcgccg taccgggca tccccgtgga ggagctcttc
 2100
 aagctgctga aggaaggcca ccgcatggac aagccggcca actgcacgca tgacctgtac
 2160
 atgatcatgc gcgagtgtg gcacgcccgc ccctcgaga ggccacctt caagcagctg
 2220
 gtggaggacc tggaccgtgt gctcacctg acgtccaccg acgagtacct ggacctgtcg
 2280
 gtgcccttcg agcagtactc gccgggcggc caggacaccc ccagctccgg ctctcgggg
 2340
 gacgactccg tgttcgtca cgacctgtg cccccggccc catccggcag cggaggctcg
 2400
 cggacgtga
 2409

<210>8

<211>802

<212> PRT

5 <213> Bos taurus FGFR3IIIc

<400> 8

```

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

```


Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Met	Ser	Ser	Asn	Thr	Pro
			420					425					430		
Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Ala
		435					440					445			
Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Leu	Ser
	450				455					460					
Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly
465				470					475						480
Gln	Val	Val	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Arg	Ala	Ala
			485					490						495	
Lys	Pro	Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Asp
		500					505					510			
Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile
	515					520					525				
Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly
	530				535						540				
Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg
545				550					555						560
Glu	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asp
			565					570						575	
Thr	Cys	Arg	Leu	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser
			580					585					590		
Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys
	595						600					605			
Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asp
	610				615						620				
Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn
625				630						635					640
Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp
			645					650					655		
Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp
			660				665						670		
Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly
		675					680					685			
Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys
	690				695						700				
Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	His	Asp	Leu	Tyr
705				710						715					720
Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr
			725						730					735	
Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Val	Thr	Ser
			740					745					750		
Thr	Asp	Glu	T												

<210>9

<211> 2409

<212> ADN

5 <213> Mus musculus FGFR3IIIb

<400> 9

atggtagtcc cggcctgcgt gctagtgttc tgcgtggcgg tcgtggctgg agctacttcc 60
 gagcctcctg gtccagagca gcgagttgtg cggagagcgg cagaggttcc agggcctgaa 120
 cctagccagc aggagcaggt ggccttcggc agtggggaca ccgtggagct gagctgccat 180
 cctcctggag gtgccccac agggcccacg gtctgggcta aggatggtac aggtctggtg 240
 gcctcccacc gcacccctggg ggggcctcag aggtgcaag tgctaaatgc cccccacgaa 300
 gatgcagggg tctacagctg ccagcaccgg ctactcggc gtgtgctgtg ccacttcagt 360
 gtgctgttaa cagatgtctc atcctcagga gatgacgaag atggggagga cgtggctgaa 420
 gacacagggg ctctttattg gactcgcccg gagcgaatgg ataagaaact gctggctgtg 480
 ccagccgcaa aactgtccg cttccgctgc ccagctgtg gcaaccctac cccctccatc 540
 tcttggtga agaattggcaa agaattccga ggggagcatc gcattggggg catcaagctc 600
 cggcaccagc agtggagctt ggtcatggaa agtgtggtac cctccgatcg tggcaactat 660
 acctgtgtag ttgagaacaa gtttggcagc atccggcaga catacacact ggatgtgctg 720
 gagcgctccc cacaccggcc catcctgcag gctgggctgc cggccaacca gacagccatt 780
 ctaggcagtg acgtggagtt ccactgcaag gtgtacagcg atgcacagcc acacatccag 840
 tggctgaagc acgtggaagt gaacggcagc aagggtgggc ctgacggcac gccctacgtc 900
 actgtactca agtcctggat cagtgagaat gtggaggcag acgcacgcct ccgcctggcc 960
 aatgtgtcgg agcgggacgg gggcgagtac ctctgtcgag ccaccaattt cataggcgtg
 1020
 gctgagaagg ccttttggct gcgtgttcac gggccccaag cagctgagga ggagctgatg
 1080
 gaaactgatg aggtggcag cgtgtacga ggcgtcctca gctacggggg ggtcttcttc
 1140
 ctcttcatcc tgggtggtggc agctgtgata ctctgccgce tgcgcagtc cccaaagaag
 1200
 ggcttgggct cgcccaccgt gcacaaggtc tctcgcttcc cgcttaagcg acaggtgtcc
 1260
 ttggaatcta actcctctat gaactccaac acacccttg tccggattgc ccggtgtcc
 1320
 tcaggagaag gtctgttct ggccaatgtt tctgaacttg agctgcctgc tgaccccaag
 1380
 tgggagctat ccaggaccgg gctgacactt ggtaagcctc ttggagaagg ctgctttgga
 1440
 caggtggtca tggcagaagc tattggcatc gacaaggacc gtactgcaa gcctgtcacc
 1500
 gtggccgtga agatgtctga agatgatgcg actgacaagg acctgtcgga cctggatatc
 1560
 gagatggaga tgatgaaaat gattggcaag cacaagaaca tcattaacct gctgggggcg
 1620
 tgcacacagg gtgggcccct gtatgtgctg gtggagtacg cagccaaggg caatctccgg
 1680
 gagttccttc gggcgcgggc gcctccaggc atggactact cctttgatgc ctgcaggctg
 1740
 ccagaggaac agctcacctg caaggatcta gtgtcctgtg cctaccaggt ggcaaggggc
 1800
 atggaatact tggcttctca gaagtgtatt cacagagact tggctgccag aaacgtcctg
 1860
 gtgaccgagg acaatgtgat gaagattgcg gactttggcc tggctcgaga tgtgcacaac
 1920
 ctggactact acaagaagac cacaatggc cggctacctg tgaagtggat ggcaccagag
 1980
 gccctttttg accgagtcta caccaccag agtgatgttt ggtcttttgg tgtcctctc
 2040

tgggagatct ttacgctggg gggctcaccg tatlctggca tcccagtgga agagcttttc
 2100
 aagctgttga aagagggcca ccgcatggac aagccagcca gctgcacaca tgacctgtac
 2160
 atgatcatgc gggaaatgttg gcatgcggtg ccttcacaga ggcccacctt caagcagttg
 2220
 gtagaggatt tagaccgcat cctcactgtg acatcaaccg acgagtactt ggacctctcc
 2280
 gtgccgtttg agcagtactc gccaggtggc caggacacgc ctagctccag ctcgtccgga
 2340
 gatgactcgg tgttcaccca tgacctgcta cccccaggtc caccagtaa cggggggacct
 2400
 cggacgtga
 2409

<210>10

<211> 802

<212> PRT

5 <213> Mus musculus FGFR3IIb

<400>10

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

[illegible]

ES 2 374 822 T3

[illegible]

$\langle 210 \rangle_{11}$

<211> 2403

<212> ADN

5 <213> Mus musculus FGFR3IIc

<400>11

atggttagtcc	cggcctgctg	gctagtgttc	tgcgtggcgg	tcgtggctgg	agctacttcc	60
gagcctcctg	gtccagagca	gcgagttgtg	cggagagcgg	cagaggttcc	agggcctgaa	120
cctagccagc	aggagcaggt	ggccttcggc	agtggggaca	ccgtggagct	gagctgccat	180
cctcctggag	gtgccccac	agggcccacg	gtctgggcta	aggatggtac	aggtctggtg	240
gcctcccacc	gcatcctggt	ggggcctcag	aggctgcaag	tgctaaatgc	ctcccacgaa	300
gatgcagggg	tctacagctg	ccagcaccgg	ctcactcggc	gtgtgctgtg	ccacttcagt	360
gtgctgtaa	catagtctcc	atcctcagga	gatgacgaag	atggggagga	cgtggctgaa	420
gacacagggg	ctccttattg	gactcgcccg	gagcgaatgg	ataagaaact	gctggctgtg	480
ccagccgcaa	acactgtccg	cttcgcgtgc	ccagctgctg	gcaaccctac	ccccccatc	540
tcctggctga	agaatggcaa	agaattccga	ggggagcatc	gcattggggg	catcaagctc	600
cggcaccagc	agtggagctt	ggtcattgaa	agtgtggtac	cctccgatcg	tggcaactat	660
acctgtgtag	ttgagaacaa	gtttggcagc	atccggcaga	catacacact	ggatgtgctg	720
gagcgctccc	cacaccggcc	catcctgcag	gctgggctgc	cggccaacca	gacagccatt	780
ctaggcagtg	acgtggagtt	ccactgcaag	gtgtacagcg	atgcacagcc	acacatccag	840
tggctgaagc	acgtggaagt	gaacggcagc	aagggtgggc	ctgacggcac	gccctacgtc	900
actgtactca	agactgcagg	cgtaaacacc	accgacaagg	agctagaggt	tctgtccttg	960
cacaatgtca	cctttgagga	cgcgggggag	tacacctgcc	tggcgggcaa	ttctattggg	
1020						
ttttcccatc	actctgcgtg	gctgggtggtg	ctgccagctg	aggaggagct	gatggaaact	
1080						
gatgaggctg	gcagcgtgta	cgcaggcgctc	ctcagctacg	gggtggtcct	cttcctcttc	
1140						
atcctgggtg	tggcagctgt	gataactctgc	cgcctgcgca	gtcccccaaa	gaagggcctt	
1200						
ggctcgccca	ccgtgcacaa	ggtctctcgc	ttcccgttta	agcgacaggt	gtccttgtaa	
1260						
tctaactcct	ctatgaactc	caacacacc	cttgtccgga	ttgcccggt	gtcctcagga	
1320						
gaaggtcctg	ttctggccaa	tgtttctgaa	cttgagctgc	ctgctgaccc	caagtgggag	
1380						
ctatccagga	cccggctgac	acttggtgta	cctcttgagg	aaggctgctt	tggacaggtg	
1440						
gtcatggcag	aagctatttg	catcgacaag	gaccgtactg	ccaagcctgt	caccgtggcc	
1500						
gtgaagatgc	tgaagatga	tgcgactgac	aaggacctgt	cggacctggt	atctgagatg	
1560						

gagatgatga aaatgattgg caagcacaag aacatcatta acctgctggg ggcgtgcaca
1620
caggggtgggc ccctgtatgt gctggtggag tacgcagcca agggcaatct cggggagttc
1680
cttcgggcgc ggcggcctcc aggcattggac tactcctttg atgcctgcag gctgccagag
1740
gaacagctca cctgcaagga tctagtgtcc tgtgcctacc aggtggcacg gggcatggaa
1800
tacttggctt ctcagaagtg tattcacaga gacttggctg ccagaaacgt cctggtgacc
1860
gaggacaatg tgatgaagat tgcggacttt ggcctggctc gagatgtgca caacctggac
1920
tactacaaga agaccacaaa tggccggcta cctgtgaagt ggatggcacc agaggccctt
1980
tttgaccgag tctacacca ccagagtgat gtttggctct ttggtgtcct cctctgggag
2040
atctttacgc tgggggggctc accgtatcct ggcatcccag tggaagagct tttcaagctg
2100
ttgaaagagg gccaccgcat ggacaagcca gccagctgca cacatgacct gtacatgatc
2160
atgcgggaat gttggcatgc ggtgccttca cagaggccca cttcaagca gttggtagag
2220
gatttagacc gcacctcac tgtgacatca accgacgagt acttggacct ctccgtgccg
2280
tttgagcagt actcgccagg tggccaggac acgcctagct ccagctcgtc cggagatgac
2340
tcggtgttca cccatgacct gctaccccca ggtccacca gtaacggggg acctcggacg
2400
tga
2403

<210>12

<211> 800

<212> PRT

5 <213> Mus musculus FGFR3IIIc

<400> 12

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

145					150					155				160
Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Gly	Asn
				165					170					175
Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Arg	Gly
			180					185					190	
His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu
		195					200					205		
Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val
	210					215					220			
Glu	Asn	Lys	Phe	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Val
225					230					235				240
Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala
				245					250					255
Gln	Thr	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	Lys	Val
			260					265					270	
Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	Glu	Val
	275						280					285		Asn
Gly	Ser	Lys	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	Val	Leu
	290					295					300			Lys
Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Ser
305				310						315				320
His	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala
				325					330					335
Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Val	Val	Leu
			340					345					350	Pro
Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Met	Glu	Thr	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	Val	Tyr
	355					360					365			Ala
Gly	Val	Leu	Ser	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Val
	370					375					380			Val
Ala	Ala	Val	Ile	Leu	Cys	Arg	Leu	Arg	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Gly
385					390					395				400
Gly	Ser	Pro	Thr	Val	His	Lys	Val	Ser	Arg	Phe	Pro	Leu	Lys	Arg
				405					410					415
Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Asn	Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu
			420					425					430	Val
Arg	Ile	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Pro	Val	Leu	Ala	Asn
	435						440					445		Val
Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Leu	Ser	Arg
	450					455					460			Thr
Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln
465					470					475				480
Val	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Arg	Thr	Ala	Lys
				485				490						495
Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Asp	Lys
			500					505					510	Asp
Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly
	515						520					525		Lys
His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Gly
	530				535						540			Pro
Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu
545					550					555				Phe
Leu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asp	Ala
				565					570					Cys
Arg	Leu	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Cys	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys
			580					585				590		Ala
Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys
														Ile

ES 2 374 822 T3

		595						600						605					
His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val				
	610					615					620								
Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Leu	Asp				
625					630					635					640				
Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala				
				645					650					655					
Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp				
			660					665				670							
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro				
		675					680				685								
Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly				
	690					695					700								
His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Ser	Cys	Thr	His	Asp	Leu	Tyr	Met	Ile				
705					710					715					720				
Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys				
				725					730					735					
Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Asp				
			740					745				750							
Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gly				
		755					760					765							
Gln	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Thr				
	770					775				780									
His	Asp	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg	Thr				
785					790					795					800				

<210>13

<211> 2349

<212> ADN

5 <213> Mus musculus FGFR3III-delAcid

<400>13

atggttagtcc	cggcctgcgt	gctagtgttc	tgcgtggcgg	tcgtaggctgg	agctacttcc	60
gagcctcctg	gtccagagca	gcgagttgtg	cggagagcgg	cagagggttcc	agggcctgaa	120
cctagccagc	aggagcaggt	ggccttcggc	agtggggaca	cctgtggagct	gagctgccat	180
cctcctggag	gtgccccac	agggcccacg	gtctgggcta	aggatggtac	aggtctggtg	240
gcctcccacc	gcatcctggt	ggggcctcag	aggctgcaag	tgctaaatgc	ctcccacgaa	300
gatgcagggg	tctacagctg	ccagcaccgg	ctcactcggc	gtgtgctgtg	ccacttcagt	360
gtgcgtgtaa	caggggctcc	ttattggact	cgcccggagc	gaatggataa	gaaactgctg	420
gctgtgccag	ccgcaaacac	tgtccgcttc	cgtgcccag	ctgctggcaa	ccctaccccc	480
tccatctcct	ggctgaagaa	tggcaaagaa	ttccgagggg	agcatcgcat	tgggggcatc	540
aagctccggc	accagcagtg	gagcttggtc	atggaagtgt	tggatccctc	cgatcgtggc	600
aactatacct	gtgtagttga	gaacaagttt	ggcagcatcc	ggcagacata	cacactggat	660
gtgctggagc	gctccccaca	ccggcccatc	ctgcaggctg	ggctgccggc	caaccagaca	720
gccattctag	gcagtgacgt	ggagttccac	tgcaaggtgt	acagcgatgc	acagccacac	780
atccagtggc	tgaagcacgt	ggaagtgaac	ggcagcaagg	tgggccctga	cggcacgccc	840
tacgtcactg	tactcaagac	tgcaggcgct	aacaccaccg	acaaggagct	agaggttctg	900
tccttgacac	atgtcacctt	tgaggacgcg	ggggagtaca	cctgcctggc	gggcaattct	960
attgggtttt	cccatcactc	tgcgtggctg	gtggtgctgc	cagctgagga	ggagctgatg	
1020						
gaaactgatg	aggctggcag	cgtgtacgca	ggcgtcctca	gctacgggggt	ggtcttcttc	
1080						
ctcttcaccc	tgggtggtggc	agctgtgata	ctctgccgcc	tgcgcagtcc	cccaaagaag	
1140						

ggcttgggct cgcccaccgt gcacaaggtc tctcgcttcc cgcttaagcg acagggtgtcc
 1200
 ttggaatcta actcctctat gaactccaac acacccttg tccggattgc ccggctgtcc
 1260
 tcaggagaag gtctgttct ggccaatgtt tctgaacttg agctgcctgc tgaccccaag
 1320
 tgggagctat ccaggaccgg gctgacactt ggtaagcctc ttggagaagg ctgctttgga
 1380
 cagggtggtca tggcagaagc tattggcatc gacaaggacc gtactgcca gctgtcacc
 1440
 gtggcgtga agatgctgaa agatgatgcg actgacaagg acctgtcgga cctgggtatct
 1500
 gagatggaga tgatgaaaat gattggcaag cacaagaaca tcattaacct gctggggggcg
 1560
 tgcacacagg gtggggccct gtatgtgctg gtggagtacg cagccaaggg caatctccgg
 1620
 gagttccttc gggcgcgggc gctccaggc atggactact cctttgatgc ctgcaggctg
 1680
 ccagaggaac agctcacctg caaggatcta gtgtcctgtg cctaccaggt ggcacggggc
 1740
 atggaatact tggcttctca gaagtgtatt cacagagact tggctgccag aaacgtcctg
 1800
 gtgaccgagg acaatgtgat gaagattgcg gactttggcc tggctcgaga tgtgcacaac
 1860
 ctggactact acaagaagac cacaatggc cggctacctg tgaagtggat ggcaccagag
 1920
 gccctttttg accgagtcta caccaccag agtgatgttt ggtcttttgg tgtcctctc
 1980
 tgggagatct ttacgctggg gggctcaccg tatcctggca tcccagtgga agagcttttc
 2040
 aagctgttga aagagggcca ccgcatggac aagccagcca gctgcacaca tgacctgtac
 2100
 atgatcatgc gggaaatgtt gcatgcggtg cttcacaga ggccacctt caagcagttg
 2160
 gttaggatt tagaccgat cctcactgtg acatcaaccg acgagtactt ggacctctcc
 2220
 gtgcccgttg agcagtactc gccagggtggc caggacacgc ctagctccag ctcgtccgga
 2280
 gatgactcgg tgttcaccca tgacctgcta ccccaggtc caccagtaa cgggggacct
 2340
 cggacgtga
 2349

<210>14

<211> 782

<212> PRT

5 <213> Mus musculus FGFR3III-delAcid

<400> 14

Met	Val	Val	Pro	Ala	Cys	Val	Leu	Val	Phe	Cys	Val	Ala	Val	Val	Ala
1				5					10					15	
Gly	Ala	Thr	Ser	Glu	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Gln	Arg	Val	Val	Arg	Arg
			20					25					30		
Ala	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Ser	Gln	Gln	Glu	Gln	Val	Ala
		35					40					45			
Phe	Gly	Ser	Gly	Asp	Thr	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	His	Pro	Pro	Gly	Gly

50	55	60
Ala Pro Thr Gly Pro Thr Val Trp Ala Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val		
65	70	75
Ala Ser His Arg Ile Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val Leu Asn		
	85	90
Ala Ser His Glu Asp Ala Gly Val Tyr Ser Cys Gln His Arg Leu Thr		
	100	105
Arg Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Gly Ala Pro Tyr		
	115	120
Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala		
	130	135
Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro		
145	150	155
Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Arg Gly Glu His Arg		
	165	170
Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu		
	180	185
Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn		
	195	200
Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg		
	210	215
Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr		
225	230	235
Ala Ile Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp		
	245	250
Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser		
	260	265
Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala		
	275	280
Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn		
	290	295
Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser		
305	310	315
Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu		
	325	330
Glu Glu Leu Met Glu Thr Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Val		
	340	345
Leu Ser Tyr Gly Val Val Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala		
	355	360
Val Ile Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser		
	370	375
Pro Thr Val His Lys Val Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser		
385	390	395
Leu Glu Ser Asn Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile		
	405	410
Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Val Leu Ala Asn Val Ser Glu		
	420	425
Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg Thr Arg Leu		
	435	440
Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met		
	450	455
Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Thr Ala Lys Pro Val Thr		
465	470	475
Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser		
	485	490
Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys		

			500				505				510				
Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Gln	Gly	Gly	Pro	Leu	Tyr
515							520				525				
Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Phe	Leu	Arg
530							535				540				
Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Asp	Tyr	Ser	Phe	Asp	Ala	Cys	Arg	Leu
545	550					555					560				
Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Thr	Cys	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln
			565				570				575				
Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg
			580				585				590				
Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val	Met	Lys
595							600				605				
Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Leu	Asp	Tyr	Tyr
610							615				620				
Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu
625	630					635					640				
Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe
			645				650				655				
Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro
			660				665				670				
Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg
675							680				685				
Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Ser	Cys	Thr	His	Asp	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg
690			695				700								
Glu	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu
705	710					715					720				
Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr
			725				730				735				
Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Asp
740			745				750								
Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	His	Asp
755			760				765								
Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg	Thr		
770			775				780								

 $\langle 210 \rangle_{15}$

<211> 2409

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus FGFR3IIIb

<400>15

atggtagtcc	cggcctgcgt	gctagtgttc	tgcgtggcgg	tcgtggctgg	agttacttcc	60
gagcctcccc	gtccagagca	gcgagttggt	cggagagcgg	cagaggttcc	agggcctgaa	120
cctagccagc	aggagcaggt	ggccttcggc	agtggggaca	ctgtggagct	gagctgccat	180
ccgcctggag	gtgcccccac	aggccccact	ctctgggcta	aggacggtgt	ggggctggtg	240
gcctcccacc	gtatcctggt	ggggcctcag	aggcttcaag	tgctaaacgc	cacccatgag	300
gatgctgggg	tctacagctg	ccagcagcgg	ctaacccggc	gtgtgctgtg	ccactttagt	360
gtgcgtgtaa	cagatgctcc	gtcctcagga	gatgacgaag	atggggagga	cgtggctgaa	420
gacacagggg	ctccttactg	gactcgaccg	gagcgtatgg	ataagaaact	gctggctgtg	480
ccagctgcaa	acactgtacg	cttcgcgtgc	ccagctgctg	gcaacccac	cccctccatc	540
ccctggctga	agaacggcaa	agaattccga	ggggagcacc	gcattggggg	cattaagctc	600
cggcaccagc	agtggagctt	ggtcatggaa	agtgtggtgc	cctctgaccg	cgggaattac	660
acctgcgtgg	tgtgagaaca	gtttggcagc	atccggcaga	cgtacacctt	ggatgtgctg	720
gagcgtcccc	cacaccggcc	catactgcag	gctgggctgc	cagccaacca	gacagccgtt	780

ctgggacagt acgtggagtt ccactgcaag gtgtacagcg acgcacagcc acacatccag 840
 tggctgaagc acgtggaggt gaatgggagc aagggtgggccc ctgacggcac gccctacgtc 900
 actgtactca agtcctggat cagtgagaat gtggaggcag acgcacgcct ccgcctggcc 960
 aatgtgtcgg agcgggacgg gggcgagtac ctctgtcag ccaccaattt cataggcgtg
 1020
 gccgagaagg ccttttggct tcgtgttcac gggccccaag cagccgagga ggagctgatg
 1080
 gaagttgacg aggcctggcag cgtgtacgcg ggtgtcctca gctacggggg gggcttcttc
 1140
 ctcttcatcc tgggtggtggc ggcagtgacg ctctgccgtc tgcgcagtcc cccaaagaag
 1200
 ggcctgggct cggccaccgt gcacaaggtc tctcgcttcc cgcttaagcg acaggtgtcc
 1260
 ttggagtcta attcctctat gaactccaac acacctctcg tccggattgc cgggctgtcc
 1320
 tcaggagaag gtcctgtcct ggccaatgtt tctgaacttg agctgcctgc tgacccaag
 1380
 tgggagctat ccaggacccg gctgacactc ggtaagcctc ttggagaagg ctgctttgga
 1440
 caggttgtca tggcagaagc tattggcatc gacaaggacc gactgccaa gcctgtcacc
 1500
 gtggccgtga agatgctgaa agatgatgcg actgacaagg acctgtcgga cctgggtgtct
 1560
 gagatggaga tgatgaaaat gattggcaag cacaagaaca tcattaacct gttggggggc
 1620
 tgcaccagg gtggggccct gtatgtgctg gtggagtatg cagccaaggg caacctgcga
 1680
 gagttcctcc gggcacggcg gcctccaggc atggattact cctttgatgc ctgcaggctg
 1740
 ccagaggaac agctcacctg caaggatctg gtgtcctgtg cctaccaggt ggcacggggc
 1800
 atggagtact tggcttccca gaagtgtatt cacagagacc tggctgccag aaacgtgctg
 1860
 gtgactgagg acaatgtgat gaagattgca gactttggcc tggcccgaga tgtgcacaac
 1920
 ctggattact acaagaagac cacaatggc cggctacctg tgaagtggat ggcaccagag
 1980
 gccctttttg accgagtcta caccatcag agtgatgtct ggtcctttgg tgcctcctc
 2040
 tgggagatct ttacactggg tgggtcacca tctcctggca tcccagtggg agagcttttc
 2100
 aagctgttga aagagggcca ccgcatggac aagccagcca actgcacaca tgacctgtac
 2160
 atgatcatgc ggggaatgttg gcatgcagtg ccttcacaga ggcccacctt caagcagttg
 2220
 gtagaggatt tagaccgcat cctcacggtg acatcaactg acgagtactt ggacctctcg
 2280
 gtgccatttg aacagtactc gccagggtgg caagatactc ctagctccag ctctgccggg
 2340
 gacgactctg tgttcaccca tgacctgcta cccccaggcc caccagcaa tgggggacct
 2400
 cggacgtga
 2409

<210>16

<211> 802

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus FGFR3IIb

<400>16

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

Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ser Ser Met Asn Ser Asn Thr Pro
 420 425 430
 Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Val Leu Ala
 435 440 445
 Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser
 450 455 460
 Arg Thr Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly
 465 470 475 480
 Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Thr Ala
 485 490 495
 Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp
 500 505 510
 Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile
 515 520 525
 Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly
 530 535 540
 Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg
 545 550 555 560
 Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Asp Tyr Ser Phe Asp
 565 570 575
 Ala Cys Arg Leu Pro Glu Glu Gln Leu Thr Cys Lys Asp Leu Val Ser
 580 585 590
 Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Gln Lys
 595 600 605
 Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp
 610 615 620
 Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn
 625 630 635 640
 Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp
 645 650 655
 Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp
 660 665 670
 Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly
 675 680 685
 Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys
 690 695 700
 Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr
 705 710 715 720
 Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr
 725 730 735
 Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Ile Leu Thr Val Thr Ser
 740 745 750
 Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Val Pro Phe Glu Gln Tyr Ser Pro
 755 760 765
 Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val
 770 775 780
 Phe Thr His Asp Leu Leu Pro Pro Gly Pro Pro Ser Asn Gly Gly Pro
 785 790 795 800
 Arg Thr

<210>17

<211>2403

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus FGFR3IIIc

<400>17

```

atggtagtc cggcctgcgt gctagtgttc tgcgtggcgg tcgtggctgg agttacttcc 60
gagcctccc gtccagagca gcgagttggt cggagagcgg cagaggttcc agggcctgaa 120
cctagccagc aggagcaggt ggccttcggc agtggggaca ctgtggagct gagctgccat 180
ccgcctggag gtgccccac aggcccccact ctctgggcta aggacggtgt ggggctgggt 240
gcctcccacc gtatcctggt ggggcctcag aggcctcaag tgctaaacgc caccatgag 300
gatgctgggg tctacagctg ccagcagcgg ctaaccggc gtgtgctgtg ccactttagt 360
gtgctgtaa cagatgctcc gtctcagga gatgacgaag atggggagga cgtggctgaa 420
gacacagggg ctcttactg gactcgaccg gagcgtatgg ataagaaact gctggctgtg 480
ccagctgcaa aactgtacg ctccgctgc ccagctgctg gcaacccac cccctccatc 540
ccctggctga agaacggcaa agaattccga ggggagcacc gcattggggg cattaagctc 600
cggcaccagc agtggagctt ggtcatggaa agtgtggtgc cctctgaccg cggcaattac 660
acctgctgg ttgagaacaa gtttggcagc atccggcaga cgtacaccct ggatgtgctg 720
gagcgtccc cacaccggcc catcctgcag gctgggctgc cagccaacca gacagccgtt 780
ctgggcagtg acgtggagtt cactgcaag gtgtacagcg acgcacagcc acacatccag 840
tggctgaagc acgtggaggt gaatgggagc aaggtgggccc ctgacggcac gccctacgtc 900
actgtactca agactgcagg agctaaccac accgacaggg agctagaggt tctgtccttg 960
cacaatgtca cctttgagga tgcgggggag tacacctgcc tggcgggcaa ttctatcggg
1020
ttttcccatc actctgcgtg gctggtggtg ctgccagccg aggaggagct gatggaagtt
1080
gacgaggctg gcagcgtgta cgcggtgtc ctgagctacg ggggtgggctt ctctctcttc
1140
atcctggtgg tggcggcagt gacgctctgc cgtctgcgca gtccccaaa gaagggcctg
1200
ggctcgccca ccgtgcacaa ggtctctcgc ttcccgtta agcgacaggt gtccttgag
1260
tctaattcct ctatgaactc caacacacct ctgctccgga ttgcccggct gtcctcagga
1320
gaaggtcctg tcctggccaa tgtttctgaa cttgagctgc ctgctgacct caagtgggag
1380
ctatccagga cccggctgac actcggtaag cctcttgag aaggctgctt tggacaggtt
1440
gtcatggcag aagctattgg catcgacaag gaccgactg ccaagcctgt caccgtggcc
1500
gtgaagatgc tgaaagatga tgcgactgac aaggacctgt cggacctggt gtctgagatg
1560
gagatgatga aaatgattgg caagcacaag aacatcatta acctgttggg ggcctgcacc
1620
caggggtggg ccctgtatgt gctggtggag tatgcagcca agggcaacct gcgagagttc
1680
ctccgggcac ggcggcctcc aggcattgat tactcctttg atgcctgcag gctgccagag
1740
gaacagctca cctgcaagga tctggtgtcc tgtgcctacc aggtggcacg gggcatggag
1800
tacttggctt ccagaaagtg tattcacaga gacctggctg ccagaaacgt gctggtgact
1860
gaggacaatg tgatgaagat tgcagacttt ggcctggccc gagatgtgca caacctggat
1920
tactacaaga agaccacaaa tggccgggcta cctgtgaagt ggatggcacc agaggccctt
1980
tttgaccgag tctacacca tcagagtgat gtctggctct ttggtgtcct cctctgggag
2040
atctttacac tgggtgggtc accatatacct ggcacccag tggaagagct tttcaagctg
2100

```

ttgaaagagg gccaccgcat ggacaagcca gccaaactgca cacatgacct gtacatgatc
 2160
 atgcgggaat gttggcatgc agtgccttca cagaggccca ccttcaagca gttggtagag
 2220
 gatttagacc gcatactcac ggtgacatca actgacgagt acttggacct ctcggtgcca
 2280
 tttgaacagt actcgccagg tggccaagat actcctagct ccagctcgtc cggggacgac
 2340
 tctgtgttca cccatgacct gctaccccca ggcccaccca gcaatggggg acctcggacg
 2400
 tga
 2403

<210>18

<211>800

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus FGFR3IIIc

<400>18

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

290	295	300
Thr Ala Gly Ala Asn	Thr Thr Asp Arg Glu	Leu Glu Val Leu Ser Leu
305	310	315
His Asn Val Thr Phe	Glu Asp Ala Gly Glu	Tyr Thr Cys Leu Ala Gly
325	330	335
Asn Ser Ile Gly Phe	Ser His His Ser Ala	Trp Leu Val Val Leu Pro
340	345	350
Ala Glu Glu Glu Leu	Met Glu Val Asp Glu	Ala Gly Ser Val Tyr Ala
355	360	365
Gly Val Leu Ser Tyr	Gly Val Gly Phe Phe	Leu Phe Ile Leu Val Val
370	375	380
Ala Ala Val Thr Leu	Cys Arg Leu Arg Ser	Pro Pro Lys Lys Gly Leu
385	390	395
Gly Ser Pro Thr Val	His Lys Val Ser Arg	Phe Pro Leu Lys Arg Gln
405	410	415
Val Ser Leu Glu Ser	Asn Ser Ser Met Asn	Ser Asn Thr Pro Leu Val
420	425	430
Arg Ile Ala Arg Leu	Ser Ser Gly Glu Gly	Pro Val Leu Ala Asn Val
435	440	445
Ser Glu Leu Glu Leu	Pro Ala Asp Pro Lys	Trp Glu Leu Ser Arg Thr
450	455	460
Arg Leu Thr Leu Gly	Lys Pro Leu Gly Glu	Gly Cys Phe Gly Gln Val
465	470	475
Val Met Ala Glu Ala	Ile Gly Ile Asp Lys	Asp Arg Thr Ala Lys Pro
485	490	495
Val Thr Val Ala Val	Lys Met Leu Lys Asp	Asp Ala Thr Asp Lys Asp
500	505	510
Leu Ser Asp Leu Val	Ser Glu Met Glu Met	Met Lys Met Ile Gly Lys
515	520	525
His Lys Asn Ile Ile	Asn Leu Leu Gly Ala	Cys Thr Gln Gly Gly Pro
530	535	540
Leu Tyr Val Leu Val	Glu Tyr Ala Ala Lys	Gly Asn Leu Arg Glu Phe
545	550	555
Leu Arg Ala Arg Arg	Pro Pro Gly Met Asp	Tyr Ser Phe Asp Ala Cys
565	570	575
Arg Leu Pro Glu Glu	Gln Leu Thr Cys Lys	Asp Leu Val Ser Cys Ala
580	585	590
Tyr Gln Val Ala Arg	Gly Met Glu Tyr Leu	Ala Ser Gln Lys Cys Ile
595	600	605
His Arg Asp Leu Ala	Ala Arg Asn Val Leu	Val Thr Glu Asp Asn Val
610	615	620
Met Lys Ile Ala Asp	Phe Gly Leu Ala Arg	Asp Val His Asn Leu Asp
625	630	635
Tyr Tyr Lys Lys Thr	Thr Asn Gly Arg Leu	Pro Val Lys Trp Met Ala
645	650	655
Pro Glu Ala Leu Phe	Asp Arg Val Tyr Thr	His Gln Ser Asp Val Trp
660	665	670
Ser Phe Gly Val Leu	Leu Trp Glu Ile Phe	Thr Leu Gly Gly Ser Pro
675	680	685
Tyr Pro Gly Ile Pro	Val Glu Glu Leu Phe	Lys Leu Leu Lys Glu Gly
690	695	700
His Arg Met Asp Lys	Pro Ala Asn Cys Thr	His Asp Leu Tyr Met Ile
705	710	715
Met Arg Glu Cys Trp	His Ala Val Pro Ser	Gln Arg Pro Thr Phe Lys
725	730	735
Gln Leu Val Glu Asp	Leu Asp Arg Ile Leu	Thr Val Thr Ser Thr Asp

740							745					750			
Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gly
755							760					765			
Gln	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Thr
770							775					780			
His	Asp	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg	Thr
785							790					795			
800															

<210>19

<211> 2421

<212> ADN

5 <213> Gallus gallus FGFR3

<400>19

atgcggggcgg	cctgggggctc	cgtctgggtgc	ctgtgccttgg	cgggcgccgtg	cggagcgctg	60
ccggcgggcgc	gccgggcgcgg	agcggagcgg	agcggcgggc	aggcggcaga	atacttgagg	120
agcgagaccg	cctttctgga	agagttgggtg	tttggaagtg	gagataccat	tgaactttcc	180
tgtaacaccc	agagctcttc	tgtgtcagtt	ttctggttta	aagatggtat	tgggattgca	240
ccttccaaca	gaactcatat	tggacaaaaa	ctgttgaaga	taatcaatgt	gtcatatgac	300
gattcggggc	tgtacagttg	caagccaagg	cattccaacg	aggtcctggg	aaactttaca	360
gtcagagtga	cagattcccc	ttcgtcaggt	gatgatgaag	atgatgacga	tgagtcagag	420
gatacaggtg	tcccccttctg	gacccggcca	gataagatgg	agaagaagct	gctggcagtt	480
cctgcccgca	acaccgttcg	cttccgatgt	ccagcaggtg	gaaacccaac	tcccaccatt	540
tactggctga	agaatggcaa	agaattcaag	ggagagcaca	ggatcggggg	catcaagttg	600
cgacaccagc	agtggagctt	ggtgatggag	agcgttgtgc	cgtcagatcg	aggaaactac	660
acctgtgttg	tggagaacaa	atatggcaat	attaggcaca	cataccagct	tgatgtttta	720
gaacggtcac	cccaccgacc	aatcctgcaa	gcaggactcc	ctgccaatca	gactgtgggtg	780
gtcggggagca	atgttggaatt	tactgcaag	gtctacagcg	atgccagcc	tcatatccag	840
tggctgaaac	acgtagaagt	caacggcagc	aagtatggac	ctgatgggac	accctatgtc	900
acagtgtctga	agacggcgagg	tgttaacaca	acggataagg	agctagagat	tctgtacttg	960
cgaaatgtta	cttttgagga	tgctggggaa	tatacttgtc	tcgcagggaa	ttctattggg	
1020						
ttctcacatc	actctgcttg	gctgacgggtg	ctaccagcag	aggagctgat	ggaaatggat	
1080						
gattcggggct	cagtgtagcg	tggcattctc	agctatggca	ctggcttagt	cctcttcac	
1140						
ctgggtgctgg	tcattgtgat	tatctgcagg	atgaaaatgc	caaacaaaaa	ggccatgaac	
1200						
accaccactg	tacagaaagt	ctccaaattt	ccactcaaga	gacagcaggt	gtcgttggag	
1260						
tccaactctt	ccatgaattc	caacacaccc	ctgggtccgga	tcactcgtct	ctcctccagc	
1320						
gatggggccga	tgctggccaa	cgtctctgag	ctggaacttc	ctccagatcc	caagtgggaa	
1380						
ttggcacgtt	ctcgcctgac	cctggggaag	ccgcttgggtg	agggctgttt	tggccaagtg	
1440						
gtgatggcgg	aagcaattgg	gattgataaa	gacaagccaa	acaaggccat	caccgtggct	
1500						
gtcaagatgt	taaaagatga	tgccacagac	aaggaccttt	cagacctggt	ctctgagatg	
1560						
gaaatgatga	aaatgattgg	gaagcacaaa	aacatcatta	acctgctcgg	tgcttgacag	
1620						
caggacggac	cgctctacgt	gttggttgaa	tatgcatcga	aggggaactt	gcgggaatac	
1680						

ctcagggcac gtcgcccacc tggcatggac tattccttcg acacctgcaa gctgccccgag
1740
gagcagttga catttaaaga cctgggttcc tgcgcctacc aggtggccccg gggcatggag
1800
tacttggcgt cacagaaatg cattcatcgt gacttggcag ccaggaatgt gttagtcact
1860
gaggacaatg tgatgaaaat agctgatttt ggccttgcta gagacgttca caacatcgac
1920
tattacaaga aaaccaccaa tggtcggctg cctgtgaaat ggatgggtcc agaagcattg
1980
tttgaccggg tctataactca ccagagcgat gtctgggtctt ttggagtgtct actatgggag
2040
atcttcactt tgggaggggtc tccgtacccg ggaattcctg ttgaagaact cttcaaactc
2100
ttgaaagaag gccatcggat ggataaaccg gccaaactgta cccacgacct gtacatgatc
2160
atgctgggagt gctggcacgc tgtcccctcg cagcgaccca cattcaagca gctgggtggaa
2220
gacctggaca gagtccctcac catgacatcc actgatgagt acctggacct ctcggtgccc
2280
tttgagcaat actcaccgcg tggccaggac acccacagca cctgctctc aggggacgac
2340
tcggtttttg cacatgacct gctgcctgat gagccctgcc tgcccaagca cgtgccctgt
2400
aatggcgtca tccgcacgtg a
2421

<210>20

<211> 806

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus FGFR3

<400> 20

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

			180					185					190			
His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	
		195					200					205				
Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	
	210					215					220					
Glu	Asn	Lys	Tyr	Gly	Asn	Ile	Arg	His	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	
225					230					235					240	
Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	
				245					250					255		
Gln	Thr	Val	Val	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	
			260					265					270			
Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Val	Glu	Val	Asn	
		275					280					285				
Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Thr	Pro	Tyr	Val	Thr	Val	Leu	Lys	
	290					295					300					
Thr	Ala	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Ile	Leu	Tyr	Leu	
305					310					315					320	
Arg	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	
				325					330					335		
Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	
			340					345					350			
Ala	Glu	Glu	Leu	Met	Glu	Met	Asp	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Gly	
		355					360					365				
Ile	Leu	Ser	Tyr	Gly	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Ile	Leu	Val	Leu	Val	
	370					375					380					
Ile	Val	Ile	Ile	Cys	Arg	Met	Lys	Met	Pro	Asn	Lys	Lys	Ala	Met	Asn	
385					390					395					400	
Thr	Thr	Thr	Val	Gln	Lys	Val	Ser	Lys	Phe	Pro	Leu	Lys	Arg	Gln	Gln	
				405					410					415		
Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Asn	Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	
			420					425					430			
Arg	Ile	Thr	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	Met	Leu	Ala	Asn	Val	
		435					440					445				
Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Leu	Ala	Arg	Ser	
	450					455					460					
Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Gly	Cys	Phe	Gly	Gln	Val	
465					470					475					480	
Val	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Asn	Lys	Ala	
				485					490					495		
Ile	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp	Ala	Thr	Asp	Lys	Asp	
			500					505					510			
Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	
		515					520									

625					630					635					640
Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala
				645					650					655	
Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp
			660					665					670		
Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro
		675					680					685			
Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly
	690					695					700				
His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	His	Asp	Leu	Tyr	Met	Ile
705					710					715				720	
Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys
				725					730					735	
Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Ser	Thr	Asp
		740						745				750			
Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ala	Gly
		755					760					765			
Gln	Asp	Thr	His	Ser	Thr	Cys	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ala
	770					775				780					
His	Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Lys	His	Val	Pro	Cys
785					790				795					800	
Asn	Gly	Val	Ile	Arg	Thr										
				805											

<210> 21

<211> 2484

<212> ADN

5 <213> *Xenopus laevis* FGFR3-1

<400> 21

```

atgtctaagg ctggaggggg ctgtggaatt gccctttatc aagggatcca tatgggaatt 60
gtcaccctgt tctgcactct ctgctttttt ctggtctctg tgaactgtgt cccggctgcc 120
cgactgccag ttacgtctcc tggagaggac agagcaaaca gaaaagcatc agattatctc 180
acggtagaac agccccatt cgatgagctc atgtttacaa ttggagaaac cattgagttg 240
tctgtctctg cggatgatgc atccacgacc accaagtggg tcaaggatgg tatcggcatt 300
gtgccgaaca acagaacaag tacgaggcag ggcctgtctg agattatcaa catctcatc 360
gatgactctg ggatatacag ttgcagacta tggcattcta ctgaaattct gcgcaatttt 420
accatcagag taacagactt accatcgtcc ggtgatgatg aggatgacga tgatgaaacc 480
gaagacagag agcctcctcg ctggacccaa cctgagaaga tggagaagaa acttattgca 540
gtccctgccc ctaacacaat ccgattccgg tgcccagccg cgggggaatcc caccctacc 600
atccattggc ttaagaacgg aaaggaattc aggggagagc atcgtattgg tggcatcaaa 660
ctccgacatc agcagtggag cctcgttatg gagagcgtag ttccatcgga taaaggcaac 720
tacacgtgtg tagtggagaa caaatatgga agcatccgtc aaacctatca acttgatgtc 780
ctggagaggc cctctcaccg gcccatcctt caggccgggt taccgcgcaa ccagacgggtg 840
gtgtttggga gcgacgtgga attccactgc aaagtctaca gtgacgcaca gccacatatt 900
cagtggctta aacacgtgga agtgaatggc agcaagtacg gccacagcgg agatccttac 960
gtcacagtgc tgcaatcttt caccaatggc actgaagtcg attctacctt aagtctaaaa
1020
aatgtgaccg agaccatga aggacagtat gtgtgtagag ccaacaattt cataggagta
1080
gccgagggcat ccttttggct ccacatttac aaaccagcac cagcagaacc agtggagaag
1140
ccagcaacca catcttccag ctccatcacc gttcttattg tggtcacctc gactattgtg
1200

```

ttcatactgt tggttatcat tgtcatcacc taccgcatga aggtcccttc taagaaggca
1260
atgagcacc cgccggtgca taaagtctcc aagttcccg tcaagcggca ggtgtctcta
1320
gagtccaact cttctatgaa ttccaacacc ccgctggtga ggatcactca cctgtcctcc
1380
agcgacggaa ccatgttggc taatgtgtcg gagctcggcc tgcccctgga tcccaagtgg
1440
gagttattga gatcaaggct gactttagga aagccccttg gagaaggctg ctttgggtcaa
1500
gtagtgatgg cagaagcaat tggcattgat aaggaaaggc caaataagcc tgttactgta
1560
gctgtaaaga tgcttaaaga tgatgctaca gataaagatc tctccgatct ggtctcggag
1620
atggagatga tgaaaatgat tgggaagcac aaaaatatca tcaatctgct aggagcatgc
1680
actcaggatg gaccactgta cgttcttctg gaatatgcat ccaaagggaa cctcaggagg
1740
tatttaaagg cacggcgccc ccaggaatg gattattctt ttgacacctg caaaattcca
1800
gctgagcagc tgacgttcaa ggacctcggt tcttgccgct accaggtagc tcgtggcatg
1860
gagtacctgg cgtcgcaaaa atgtattcac agagatctgg cagccagaaa tgtgttagta
1920
acagatgaca ttgtaatgaa gattgcagat ttcggcttgg ccagggacat ccacaacata
1980
gattattaca agaaaacaac aaatgggtcgg ctgccagtca aatggatggc tccggaagct
2040
ttgttcgacc gtatctacac tcatcagagc gatgtatggc cgtacggagt gctgctgtgg
2100
gagatattta cactgggggg ctcgccctac ccagggatcc cagtagagga actctttaag
2160
ctattgaaag aaggccacag aatggacaag ccagcaaact gcacacatga actgtatatg
2220
atcatgagag agtgcctggc cgctgtccca tcgcaaagac caaccttcaa gcagctgggt
2280
gaagaccttg accgcgttct tactgtaaca tctactgatg agtacctgga cctgtcggta
2340
ccattcgagc agtattcccc ggcgggccaa gacagtaaca gcacctgctc ctcgggggac
2400
gactcagtct ttgctcatga cattttaccc gatgaaccgt gtcttcccaa acaacagcag
2460
tacaacggcg ccatccgaac atga
2484

<210>22

<211> 827

<212> PRT

5 <213> Xenopus laevis FGFR3-1

<400> 22

Met	Ser	Lys	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Gly	Ile	Ala	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ile
1				5					10					15	
His	Met	Gly	Ile	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	Thr	Leu	Cys	Phe	Phe	Leu	Val
			20					25					30		
Ser	Val	Asn	Cys	Val	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Gly

Glu	Asp	Arg	Ala	Asn	Arg	Lys	Ala	Ser	Asp	Tyr	Leu	Thr	Val	Glu	Gln
	50					55					60				
Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	Leu	Met	Phe	Thr	Ile	Gly	Glu	Thr	Ile	Glu	Leu
65					70					75					80
Ser	Cys	Ser	Ala	Asp	Asp	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Lys	Trp	Phe	Lys	Asp
				85					90					95	
Gly	Ile	Gly	Ile	Val	Pro	Asn	Asn	Arg	Thr	Ser	Thr	Arg	Gln	Gly	Leu
				100					105				110		
Leu	Lys	Ile	Ile	Asn	Ile	Ser	Tyr	Asp	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys
							120					125			
Arg	Leu	Trp	His	Ser	Thr	Glu	Ile	Leu	Arg	Asn	Phe	Thr	Ile	Arg	Val
	130					135					140				
Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Asp	Asp	Glu	Thr
145					150					155					160
Glu	Asp	Arg	Glu	Pro	Pro	Arg	Trp	Thr	Gln	Pro	Glu	Lys	Met	Glu	Lys
				165					170					175	
Lys	Leu	Ile	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr	Ile	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro
				180					185				190		
Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Thr	Ile	His	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys
							200					205			
Glu	Phe	Arg	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln
	210					215					220				
Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp	Lys	Gly	Asn
225					230					235					240
Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Glu	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ser	Ile	Arg	Gln	Thr	Tyr
				245					250					255	
Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	Ser	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala
			260					265					270		
Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	Thr	Val	Val	Phe	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe
			275				280					285			
His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys
						295					300				
His	Val	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Asp	Pro	Tyr
305				310						315					320
Val	Thr	Val	Leu	Gln	Ser	Phe	Thr	Asn	Gly	Thr	Glu	Val	Asp	Ser	Thr
				325					330					335	
Leu	Ser	Leu	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Thr	His	Glu	Gly	Gln	Tyr	Val	Cys
			340					345					350		
Arg	Ala	Asn	Asn	Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Ser	Phe	Trp	Leu	His
		355					360					365			
Ile	Tyr	Lys	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr
						375					380				
Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Val	Leu	Ile	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Ile	Val
385					390					395					

				485						490						495	
Cys	Phe	Gly	Gln	Val	Val	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Glu		
			500					505					510				
Arg	Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Asp	Asp		
		515					520					525					
Ala	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met		
	530					535					540						
Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys		
545					550					555					560		
Thr	Gln	Asp	Gly	Pro	Leu	Tyr	Val	Leu	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly		
				565					570						575		
Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Pro	Gly	Met	Asp	Tyr		
			580					585					590				
Ser	Phe	Asp	Thr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ala	Glu	Gln	Leu	Thr	Phe	Lys	Asp		
		595					600					605					
Leu	Val	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Ala		
	610					615					620						
Ser	Gln	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val		
625					630					635					640		
Thr	Asp	Asp	Ile	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp		
				645					650					655			
Ile	His	Asn	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro		
			660					665					670				
Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Arg	Ile	Tyr	Thr	His		
		675					680					685					
Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr		
	690					695					700						
Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Lys		
705					710					715					720		
Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys	Thr	His		
				725					730					735			
Glu	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro	Ser	Gln		
			740					745					750				
Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Val	Leu	Thr		
		755					760					765					
Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Gln		
	770					775					780						
Tyr	Ser	Pro	Ala	Gly	Gln	Asp	Ser	Asn	Ser	Thr	Cys	Ser	Ser	Gly	Asp		
785					790					795					800		
Asp	Ser	Val	Phe	Ala	His	Asp	Ile	Leu	Pro	Asp	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro		
				805					810					815			
Lys	Gln	Gln	Gln	Tyr	Asn	Gly	Ala	Ile	Arg	Thr							

 $\langle 210 \rangle_{23}$

<211> 2409

<212> ADN

5 <213> Xenopus laevis FGFR3-2

<400> 23

atgggtctctgt	tgaatgggtgt	cccggtctgcc	cgactgccag	ttacgctccc	tggagaggac	60
agagcgagca	gaaaagcacc	agattatctc	atggtagaac	agccccatt	cgatgaactc	120
atgtatacaa	ttggagaaac	catttgagttg	tcctgcgctg	cagaagatgc	ttccacaact	180
accaatgtgt	gtaaggatgg	tattggcatt	gtaccgaaca	acagaaacaag	cacaaggcag	240
ggcctgtcta	agattatcaa	cgtctccctcc	gatgactccg	ggatatacacg	ctgcgagacta	300


```

tggcattcta ccgagattct gcgcaatttt acaatcagag taacagactt gccatcatct 360
. ggtgacgatg aggatgatga tgatgatgat gatgatgaaa ccgaagacag agaacctcct 420
cgctggaccc aacctgagag gatggaaaag aaacttattg cagtccctgc tgctaacaca 480
atccgcttcc ggtgcccagc cgcagggaat cccaccctta ccatccactg gctaaagaac 540
ggaaaggagt tcagggggga acatcgtatt ggtggcatca aactccgaca tcaacagtgg 600
agccttggtta tggagagtgt ggtcccatca gataaaggca actacacgtg tgtgggtggag 660
aacaaatatg gaagcatccg tcaaacctat caacttgatg tccttgagag gtcctctcac 720
cggcccatcc ttcaggctgg gttaccggc aaccagacgg ttgtgcttgg gagcgacgtg 780
gaattccact gcaaagtcta cagtgcgca caacctcata ttcagtggct taaacacgtg 840
gaagtgaatg gcagcaaata cggcccagac ggagatcctt acgtctcagt gttgcaatct 900
ttcatcaatg gactgaagt cgattctacc ctaagtctaa aaaatgtgac cgagaccaat 960
gaaggacagt atgtgtgtag agccaacaat ttcataggag tagccgaggc atccttttgg
1020
ctccacattt acaaaccagc accagcagaa ccagtggaga aggcattgac aacatcttcc
1080
agctctatca ccgtccttat tgtggtcacc tcgaccattg tgttcatact gttgggttatc
1140
atcgtcatca cccacctcat gaaggctcct tccaagaagt caatgaccgc cccaccgggtg
1200
cataaagtct ccaagttccc cctcaaacgg cagcaggtgt ctctagagtc caactcttct
1260
atgaattcca acaccccggt ggtgaggatc actcatctgt cctccagcga tggaaccatg
1320
ctggctaattg tgtcggaact tggcctgcca cttgacccca agtgggagtt attgagatca
1380
aggctgactt taggaaagcc cctcggggaa ggctgcttcg gtcaggtggg gatggcagaa
1440
gctattggca ttgataagga aaggccaaat aagcctgcta ctgtagctgt aaagatgctt
1500
aaagacgatg ccacagataa agatctctca gatctggtct ctgagatgga gatgatgaaa
1560
atgattggga agcataaaaa tatcatcaat ctgctgggag catgcactca ggatgggccc
1620
ctgtacgttc tgggtggaata cgcacgaaa gggagcctca gggagtattt aaaggcacgg
1680
cgccccccag gaatggatta ttcttttgat gcctgcaaaa ttccagctga gcagctgacg
1740
ttcaaggacc tagtttcttg tgcctaccag gtagctcgtg gcatggagta cctggcatca
1800
caaaaatgca ttcacagaga tctggcagcc agaaatgtgt tagtaacaga tgacaacgta
1860
atgaagattg cagatttcgg cttggccagg gacatccaca acatagatta ttacaagaaa
1920
acaacaaatg gtcggctgcc tgtgaaatgg atggctccgg aagctttggt tgaccgtatc
1980
tacactcatc acagcgatgt atggtcgtac ggagtgtgc tgtgggagat atttacactg
2040
gggggctcac cctaccagc gatcccggtg gaggaacttt ttaagctatt gaaagaaggc
2100
cacagaatgg acaagccagc aaactgcaca catgaactgt atatgatcat gagagagtgc
2160
tggcacgctg tcccctcaca aagaccggcc ttcaagcagc tggttgaaga ccttgaccgc
2220
gttcttactg taacatctac taatgagtac ctagacctct cggtagcatt cgagcagtat
2280
tctccacca gccaagacag tcacagcacc tgctcctcag gggacgactc agtctttgct
2340
cacgacattt taccgatga accgtgtctt cccaaacacc agcagcacia cggcgccatc
2400
cccacatga
2409

```

<210>24

<211>802

<212> PRT

<213> Xenopus laevis FGFR3-2

5 <400> 24

```

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

```

[illegible]

785	790	795	800
Pro Thr			

<210>25

<211> 2391

<212> ADN

<213> Pleurodeleswaltlii FGFR3

5 <400> 25

```

atgctcgtct ggctctgcgg cttgtgtctg gtgactctgg cgggcggacg ttcggcggcc 60
aggctgcccc tcaccgaggg ccgacccaca gcagacttcc tgcccggcga cgcctccctg 120
gtggaagagc tcctgttcgg caccgggggac accatcgagc tctcctgcac cccccgggc 180
tcctctgtgt ccgtggtgtg gttcaaagac gggatctcgg tggaccacc aacctggtcc 240
cacaccggcc agaagctgct gaagatcatc aacgtgtcct acgacgactc gggagtgtac 300
agctgcaagg cccggcagtc cagcgagggtg ctccgggaacg tgaccgtcag ggtgaccgat 360
tctccgtcat ccggtgatga cgaagatgat gatgaggaat ctgaaagtgc aaatgcacca 420
aaattcacgc gaccggaatg gatggagaag aaactgcttg cagtgcgccg agccaacacg 480
gtgcgcttcc gatgcccagc tgcaggaaaag ccaacgccat ccatcacttg gctgaaaaac 540
ggcaaggagt tcaaaggcga gcatcggatt gggggcataa agctaagaca ccagcagtgg 600
agtgttggtga tggagagtgt agtcccattc gatcggggaa attacacatg tgtggtggca 660
aacaagtacg gcaccatccg agagacctac acattggatg tccttgaacg aactcctcac 720
cggcccatcc tccaggcggg attccgttcc aacaagactg tggtggtagg aagcgtgtg 780
gagttccatt gcaaggata cagtgatgct cagccgcaca tccagtggct gaaacacgtg 840
gagggttaatg gcagcaagtt tggacctgat gggaaaccgt atgtcacagt gcttaagacg 900
gcagggtgta atacctcgga taaggagcta gaaattcagt tcttgcgaaa tgtaactttt 960
gaggatgctg gggagtatac ttgtctcgct gggaactcta ttggctattc ccatcattct
1020
gcttggtctca cgggtgctgcc accagcagag ccggtcccag acgtcgacac ctctgtcagc
1080
attcttgccg ctgcaggatg tgtcgcagtt gttatactgg tggatgatcat aatctttact
1140
tacaagatga agatgccctc caagaagacc atgaacaccg ccactgtgca caaagtctca
1200
aagttccctc tcaagagaca ggtgtcactg gagtccaact cttcaatgaa ttccaacacc
1260
cctctggtgc gaatcacccg cctgtcgtcc agcgtatggc cgatgctggc caacgtgtcc
1320
gagctggagc taccgctga tccgaagtgg gaattgtctc gttcacgctt gactttgggc
1380
aaacctcttg gggaaggatg ctttggccag gtggtgatgg cggatgcagt tggcattgaa
1440
aaggataagc caaacaaggc cacctcgggt gccgttaaga tgttgaaaga tgatgccact
1500
gataaagacc tgtcggatct agtctctgaa atggaaatga tgaaaatgat tgggaagcac
1560
aaaaacatca ttaatctcct gggagcctgc acgcaggatg gccactcta cgtgctgggtg
1620
gaatatgcat ccaaaggaaa cttgcgggag tacctgaggg cccggcgccc tcctggcatg
1680
gattactcct tcgacacctg caaacttccc gaagagcagt tgaccttcaa ggacttggtg
1740
tcctgtgcct accaggtggc ccgcggcagc gagtacctgg cctctcagaa gtgcatacac
1800

```

cgagatctgg cagccccgaa cgtgctggtg acggatgaca acgttatgaa gattgctgat
1860
tttggcctgg cgagagatgt gcacaacatc gactactaca agaaaactac aaatggccga
1920
ctgcccgtga agtggatggc tccggaggct ttgttcgacc gggctctacac tcaccaaagc
1980
gacgtctggt cgtttggagt gcttctgtgg gagatcttca cgctgggggg ctcgccgtac
2040
cctggaatcc cagtgaaga actcttcaag ctgttaaagg aaggccatcg aatggacaaa
2100
ccagcgaact gcacgcatga gctgtacatg atcatgcggg agtgctggca tgcagtgcc
2160
tcccagcggc caaccttcaa gcaactcgta gaagacttgg accgggtcct tacggtgacc
2220
tccactgatg agtacctcga tctctctgtg cccttcgagc agtattcgcc tgccctgcc
2280
gacagccaca gcagctgctc ttctggagac gattcgggtct ttgcccacga cctgcccag
2340
gagccctgcc ttccgaagca ccagcagtac aatggagtaa tccgaacatg a
2391

<210>26

<211> 796

<212> PRT

5 <213> Pleurodeles waltlii FGFR3

<400> 26

Met	Leu	Val	Trp	Leu	Cys	Gly	Leu	Cys	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Ala	Arg	Leu	Pro	Leu	Thr	Glu	Gly	Arg	Pro	Thr	Ala	Asp
			20					25					30		
Phe	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Phe	Gly	Thr
		35					40					45			
Gly	Asp	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Ser
	50					55					60				
Val	Val	Trp	Phe	Lys	Asp	Gly	Ile	Ser	Val	Asp	Pro	Pro	Thr	Trp	Ser
65				70						75				80	
His	Thr	Gly	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Asn	Val	Ser	Tyr	Asp	Asp
			85					90						95	
Ser	Gly	Val	Tyr	Ser	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Arg
			100				105						110		
Asn	Val	Thr	Val	Arg	Val	Thr	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Glu
		115				120						125			
Asp	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Glu	Ser	Ala	Asn	Ala	Pro	Lys	Phe	Thr	Arg
	130					135					140				
Pro	Glu	Trp	Met	Glu	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Thr
145					150					155				160	
Val	Arg	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Gly	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Ile	Thr
			165					170						175	
Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Gly	Gly
		180						185					190		
Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	Glu	Ser	Val	Val
	195					200					205				
Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	Asn	Lys	Tyr	Gly
	210				215						220				
Thr	Ile	Arg	Glu	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	Arg	Thr	Pro	His

```

225          230          235          240
Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Phe Arg Ser Asn Lys Thr Val Val Val
          245          250          255
Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro
          260          265          270
His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Phe Gly
          275          280          285
Pro Asp Gly Asn Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn
          290          295          300
Thr Ser Asp Lys Glu Leu Glu Ile Gln Phe Leu Arg Asn Val Thr Phe
305          310          315          320
Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Tyr
          325          330          335
Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro Pro Ala Glu Pro Val
          340          345          350
Pro Asp Val Asp Thr Ser Val Ser Ile Leu Ala Ala Ala Gly Cys Val
          355          360          365
Ala Val Val Ile Leu Val Val Ile Ile Phe Thr Tyr Lys Met Lys
          370          375          380
Met Pro Ser Lys Lys Thr Met Asn Thr Ala Thr Val His Lys Val Ser
385          390          395          400
Lys Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ser Ser Met
          405          410          415
Asn Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Thr Arg Leu Ser Ser Ser Asp
          420          425          430
Gly Pro Met Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro
          435          440          445
Lys Trp Glu Leu Ser Arg Ser Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly
          450          455          460
Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Asp Ala Val Gly Ile Glu
465          470          475          480
Lys Asp Lys Pro Asn Lys Ala Thr Ser Val Ala Val Lys Met Leu Lys
          485          490          495
Asp Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu
          500          505          510
Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly
          515          520          525
Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ser
530          535          540
Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met
545          550          555          560
Asp Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Leu Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe
          565          570          575
Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr
          580          585          590
Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
          595          600          605
Leu Val Thr Asp Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala
610          615          620
Arg Asp Val His Asn Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg
625          630          635          640
Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr
          645          650          655
Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
          660          665          670
Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu

```

675					680					685					
Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ala	Asn	Cys
690						695					700				
Thr	His	Glu	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His	Ala	Val	Pro
705					710					715					720
Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	Leu	Asp	Arg	Val
				725					730					735	
Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Phe
			740					745					750		
Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Ala	Cys	Pro	Asp	Ser	His	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser
		755					760					765			
Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ala	His	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Pro	Cys	Leu
	770					775					780				
Pro	Lys	His	Gln	Gln	Tyr	Asn	Gly	Val	Ile	Arg	Thr				
785					790					795					

<210>27

<211> 2403

<212> ADN

5 <213> Danio rerio FGFR3

<400> 27

```

atgggtccac tctgtctcct cctgtacctc gcaaccctcg tcttcccacc agtgtacagt 60
gcacacctgc tgtccccaga gcccacagac tgggtatcga gtgagggtgga agtgtttctg 120
gaggactatg tggcgggagt cggggataca gtagttctgt cctgcacgcc gcaagacttt 180
ctccttccca tcgtatggca aaaagacgga gacgccgttt cttcaagcaa ccgtacacga 240
gtgggccaga aagccctccg catcatcaat gtctcctatg aagactcggg tgtttactcc 300
tgcagacatg cccacaagag catgcttctg agcaactaca ccgtcaaagt catcgattcg 360
ctgtcctctg gtgatgatga ggactatgat gaagatgagg acgaggcagg taatggaaat 420
gcagaagctc catactggac ccgttcggac cggatggaga agaaactatt ggctgttcct 480
gctgccaata cagtcaagtt ccgctgtcct gctgctggca acccaacgcc cagtatccat 540
tggctgaaaa atggcaagga gttcaaggga gacgagagaa tgggtggcat taagctgagg 600
catcagcagt ggagcttggt catggagagt gccgttccat ccgaccgggg aaattacaca 660
tgtgtggtgc agaacaata cgggtcaatc aagcacactt atcaactcga tgtgtctggg 720
cgctcccctc accggcccat cttacaggca ggactgccag ccaatcagac ggtagtgggt 780
ggcagtgatg tggagttcca ctgtaagggt tacagtgatg ctcagccaca catccagtgg 840
ctgaaacaca ttgaagtcaa tggaagccaa tatgggcccc atggcgcccc ctacgtcaat 900
gttcttaaga ctgctgggat aaatactacg gataaagagc tggagattct ctacctgacc 960
aatgtgtctt tcgaggatgc ggggcaatac acttgtctgg cagggaactc gattggctat
1020
aaccatcact ctgcttggtt tacagtctta ccagcgggtg agatggagag agaggatgat
1080
tatgcagaca tcctcatcta tgtgacaagc tgcgtgctct tcattctcac catggtcac
1140
attattctct gccgaatgtg gataaacacg cagaagactc tcccggcacc acctgttcaa
1200
aaactgtcca aattccccct caagagacag gtgtccttgg aatccaactc ttccatgaat
1260
tcaaacaccc cgctggtcag gatcgccgcg ctgtcatcca gcgatgggcc gatgttgctt
1320
aacgtgtctg aacttgaact gccctctgac cccaagtggg agtttactcg aacaaagtta
1380
acgttgggga aaccgttggg agagggctgc tttgggcagg tggatgatgg tgaagccatt
1440

```

gggattgaca aagaaaaacc caacaaacct ctaactgttg ctgtcaagat gctcaaagat
 1500
 gacggcacag ataaagacct gtcagacctt gtgtctgaaa tggagatgat gaagatgatt
 1560
 gggaacata agaacatcat taacttgctg ggagcatgta ctcaagacgg tcctctgtac
 1620
 gtgctggttag aatacgcctc taaagggaaat cttagggaaat acttacgagc cagaaggcca
 1680
 cctgggatgg actactcatt cgacacctgt aagatcccgga acgaaacgct aacattttaa
 1740
 gacctggtgt cctgcgccta tcaggtcgcc aggggtatgg agtacctggc ctcaaagaag
 1800
 tgtatccata gggaccccg cagcccggaat gttctggtta ccgaggacaa cgtgatgaag
 1860
 attgcagact tcggccttgc cagagatgtg cacaacattg actactacaa gaagaccacc
 1920
 aacggtcgtc tgcccgctcaa atggatggca ccagaagcac tgttcgatcg cgtctacacg
 1980
 caccagagcg atgtgtggtc ttatggtgtg ttgttgtggg agattttcac tcttggtgga
 2040
 tccccgtatc caggtatccc agtggaggag ctctttaaac tgctgaagga aggccatcgg
 2100
 atggacaaac cggccaactg cactcatgaa ctgtacatga tcatgcgaga atgttggcat
 2160
 gctgttcctt cacaagacc cacgttcaga cagctggtgg aggaccacga cagggttctt
 2220
 tccatgacct ccactgacga gtacctggac ctctctgtac cgttcgagca gtattcaccg
 2280
 acctgtccgg actccaacag cacctgttcc tctggcgatg actctgtgtt tgcccacgac
 2340
 cccttacctg aggagccatg cctccctaaa caccaccaca gcaacggggg catacgaaca
 2400
 taa
 2403

<210>28

<211>800

<212> PRT

5 <213> Danio rerio FGFR3

<400> 28

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

Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Ala	Glu	Ala	Pro	
	130					135					140					
Tyr	Trp	Thr	Arg	Ser	Asp	Arg	Met	Glu	Lys	Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	
145					150					155					160	
Ala	Ala	Asn	Thr	Val	Lys	Phe	Arg	Cys	Pro	Ala	Ala	Gly	Asn	Pro	Thr	
				165					170					175		
Pro	Ser	Ile	His	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gly	Glu	Gln	
			180					185					190			
Arg	Met	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Arg	His	Gln	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Met	
		195					200					205				
Glu	Ser	Ala	Val	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Gln	
	210					215					220					
Asn	Lys	Tyr	Gly	Ser	Ile	Lys	His	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Glu	
225					230					235					240	
Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu	Pro	Ala	Asn	Gln	
				245					250					255		
Thr	Val	Val	Val	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Phe	His	Cys	Lys	Val	Tyr	Ser	
			260					265					270			
Asp	Ala	Gln	Pro	His	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	His	Ile	Glu	Val	Asn	Gly	
		275					280					285				
Ser	Gln	Tyr	Gly	Pro	Asn	Gly	Ala	Pro	Tyr	Val	Asn	Val	Leu	Lys	Thr	
		290				295					300					
Ala	Gly	Ile	Asn	Thr	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Glu	Ile	Leu	Tyr	Leu	Thr	
305					310					315					320	
Asn	Val	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	
				325					330					335		
Ser	Ile	Gly	Tyr	Asn	His	His	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Ala	
		340					345					350				
Val	Glu	Met	Glu	Arg	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ile	Leu	Ile	Tyr	Val	
		355					360					365				
Thr	Ser	Cys	Val	Leu	Phe	Ile	Leu	Thr	Met	Val	Ile	Ile	Ile	Leu	Cys	
	370					375					380					
Arg	Met	Trp	Ile	Asn	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Gln	
385					390					395					400	
Lys	Leu	Ser	Lys	Phe	Pro	Leu	Lys	Arg	Gln	Val	Ser	Leu	Glu	Ser	Asn	
				405					410					415		
Ser	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	Thr	Pro	Leu	Val	Arg	Ile	Ala	Arg	Leu	Ser	
			420					425				430				
Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	Met	Leu	Pro	Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	
		435					440					445				
Ser	Asp	Pro	Lys	Trp	Glu	Phe	Thr	Arg	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Lys	
	450					455										

Leu	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Ala	Arg	Gly
			580					585					590		
Met	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Pro	Ala	Ala
		595					600					605			
Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val	Met	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe
	610					615					620				
Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Val	His	Asn	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr
625					630					635					640
Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp
				645					650					655	
Arg	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu
			660					665					670		
Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro	Val
		675					680					685			
Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro
	690					695					700				
Ala	Asn	Cys	Thr	His	Glu	Leu	Tyr	Met	Ile	Met	Arg	Glu	Cys	Trp	His
705					710					715					720
Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	His
				725					730					735	
Asp	Arg	Val	Leu	Ser	Met	Thr	Ser	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser
			740					745					750		
Val	Pro	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Pro	Thr	Cys	Pro	Asp	Ser	Asn	Ser	Thr
		755					760					765			
Cys	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	Phe	Ala	His	Asp	Pro	Leu	Pro	Glu
	770					775					780				
Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Lys	His	His	His	Ser	Asn	Gly	Val	Ile	Arg	Thr
785					790					795					800

<210>29

 $\langle 211 \rangle_{20}$

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> cebador de PCR 1

<400> 29

agccctcact ccttctctag 20

10 <210>30

<211>26

<212> ADN

<213> secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

15 <223> cebador de PCR 2

<400> 30

acctacaggt ggggtctttc attccc 26

 $\langle 210 \rangle_{31}$

$\langle 211 \rangle_{25}$

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador de PCR 3

<400> 31

5 ccctgggtca agcccttgt acacc 25

<210>32

<211>25

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador de PCR 4

<400> 32

tgccaaacct acaggtgggg tcttt 25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la actividad de BoNT/A poniendo en contacto una muestra con una célula que contiene un FGFR3 exógeno, en el que dicha célula puesta en contacto es capaz de intoxicarse con BoNT/A, y detectando la presencia de la actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto con respecto a una célula control, siendo la diferencia en dicha actividad de BoNT/A de dicha célula puesta en contacto en comparación con dicha célula control indicativa de actividad de BoNT/A.
2. Procedimiento para seleccionar una molécula capaz de competir con el BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A poniendo en contacto dicha muestra con una composición que comprende un FGFR3 y detectando si dicha molécula se une selectivamente a dicho FGFR3, en el que la unión selectiva de dicha molécula a dicho FGFR3 indica que dicha molécula es capaz de competir con BoNT/A para unirse selectivamente a células susceptibles de intoxicarse con BoNT/A y en el que si dicha molécula es BoNT/A, dicho procedimiento no comprende un ensayo de DL50.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha etapa de puesta en contacto se realiza *in vitro*.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho FGFR3 se expresa en la superficie de una célula.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha molécula es BoNT/A.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha molécula comprende un dominio de unión del receptor de una cadena pesada de BoNT/A.
7. Procedimiento según una cualquiera de la reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha molécula es una molécula que se une selectivamente al dominio de unión del receptor de FGFR3 y no es BoNT/A.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha molécula comprende un anticuerpo anti-FGFR3 que se une al dominio de unión del receptor de FGFR3.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha molécula comprende un FGF que se une al dominio de unión del receptor de FGFR3.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha molécula de FGF se selecciona del grupo constituido por FGF1, FGF2, FGF4, FGF8 y FGF9.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha molécula es una molécula que se une selectivamente al dominio de unión del receptor de FGFR3 y comprende un dominio de proteasa que escinde una proteína SNARE en un sitio diferente al que se escinde por la cadena ligera de BoNT/A.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho dominio de proteasa comprende el sitio activo de la cadena ligera de una toxina Clostridial diferente a la BoNT/A.
13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho dominio de proteasa comprende el sitio activo de la cadena ligera de BoNT/E.
14. Procedimiento para determinar la actividad de BoNT/A a partir de una preparación que comprende BoNT/A que comprende el procedimiento de la reivindicación 2.
15. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicha célula contiene de forma transitoria un FGFR3 exógeno.
16. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicha célula contiene de forma estable un FGFR3 exógeno.
17. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicho FGFR3 es un FGFR3 de mamífero, un FGFR3 de ave, un FGFR3 de anfibio o un FGFR3 de pez.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho FGFR3 de mamífero es un FGFR3 humano, un FGFR3 bovino, un FGFR3 de ratón o un FGFR3 de rata.
19. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicha composición contiene además un polisialogangliósido G1b.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho polisialogangliósido se selecciona del grupo constituido por GD1a, GD1b, GD3, GQ1b o GT1b.
21. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicha célula es una célula neuronal.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicha célula neuronal es una célula neuronal primaria, una célula neuronal inmortalizada o una célula neuronal transformada.

5 **23.** Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicha célula neuronal se selecciona del grupo constituido por una célula del neuroblastoma, una célula híbrida neuronal, una célula de la médula espinal, una célula del sistema nervioso central, una célula del córtex cerebral, una célula del ganglio espinal, una célula del hipocampo y una célula de feocromocitoma.

24. Procedimiento según bien la reivindicación 1 o bien la reivindicación 2, en el que dicha célula es una célula no neuronal.

10 **25.** Procedimiento según la reivindicación 24, en el que dicha célula no neuronal es una célula no neuronal primaria, una célula no neuronal inmortalizada o una célula no neuronal transformada.

26. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que dicha célula no neuronal se selecciona del grupo constituido por una célula de la pituitaria anterior, una célula suprarrenal una célula pancreática, una célula de ovario, una célula de riñón, una célula del estómago, una célula sanguínea, una célula epitelial, un fibroblasto, una célula del tiroides, un condrocito, una célula muscular, un hepatocito, una célula glandular.

15

FIGURAS

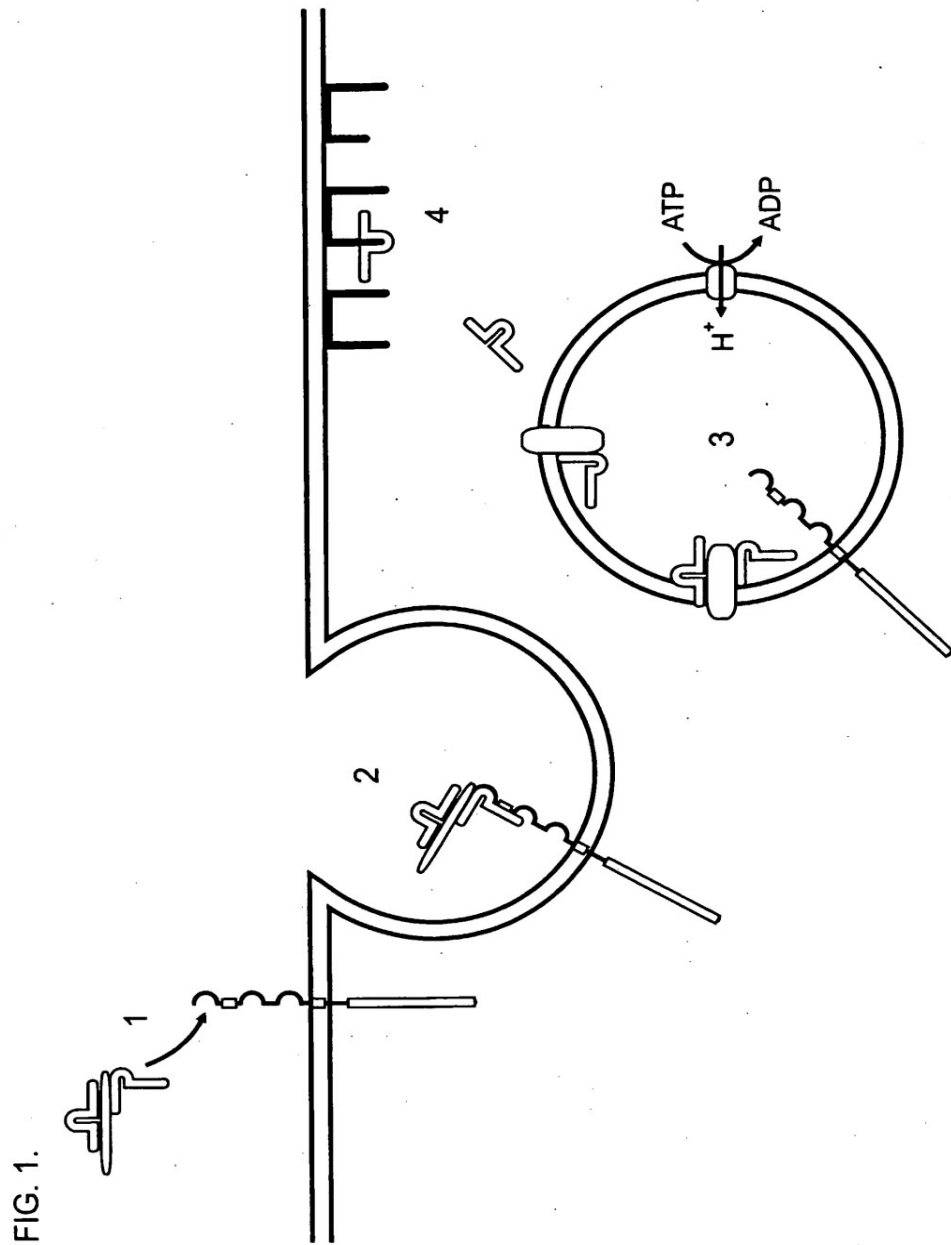


FIG. 2.

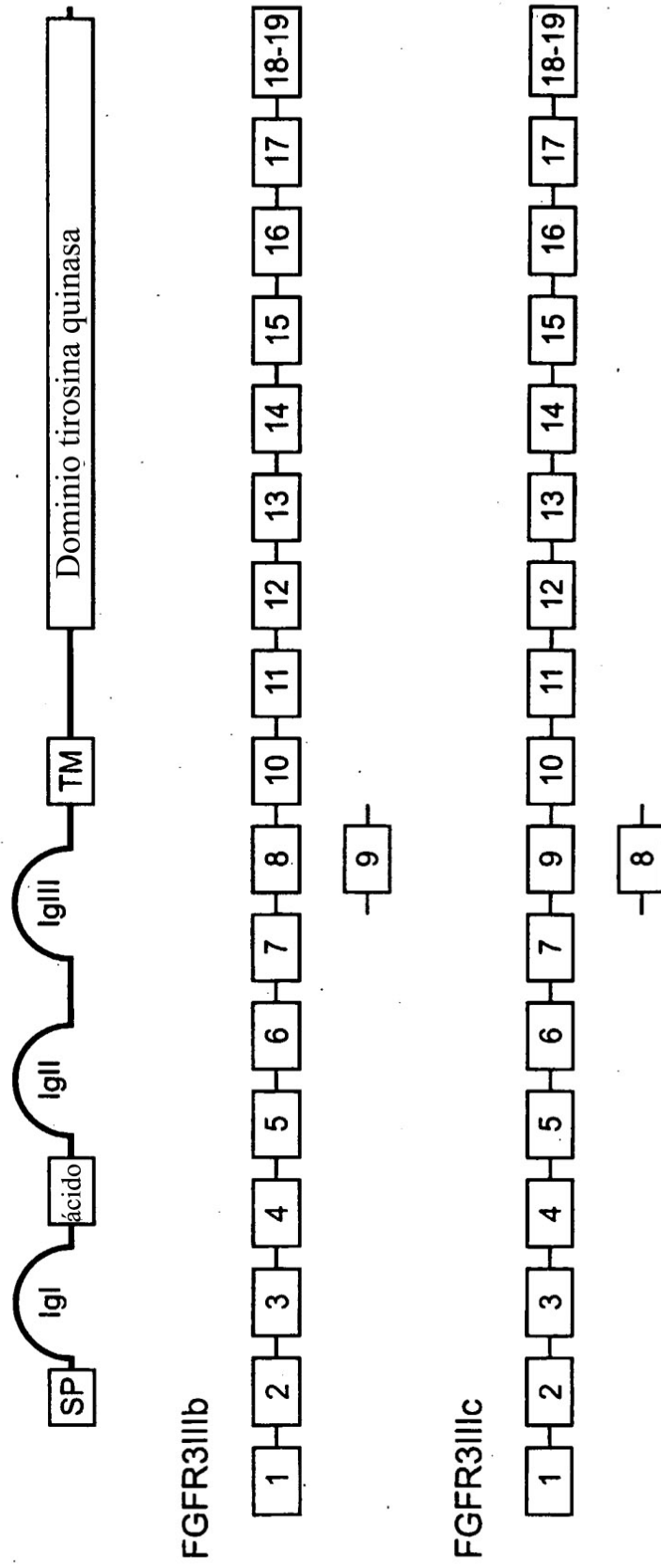


FIG. 3a.

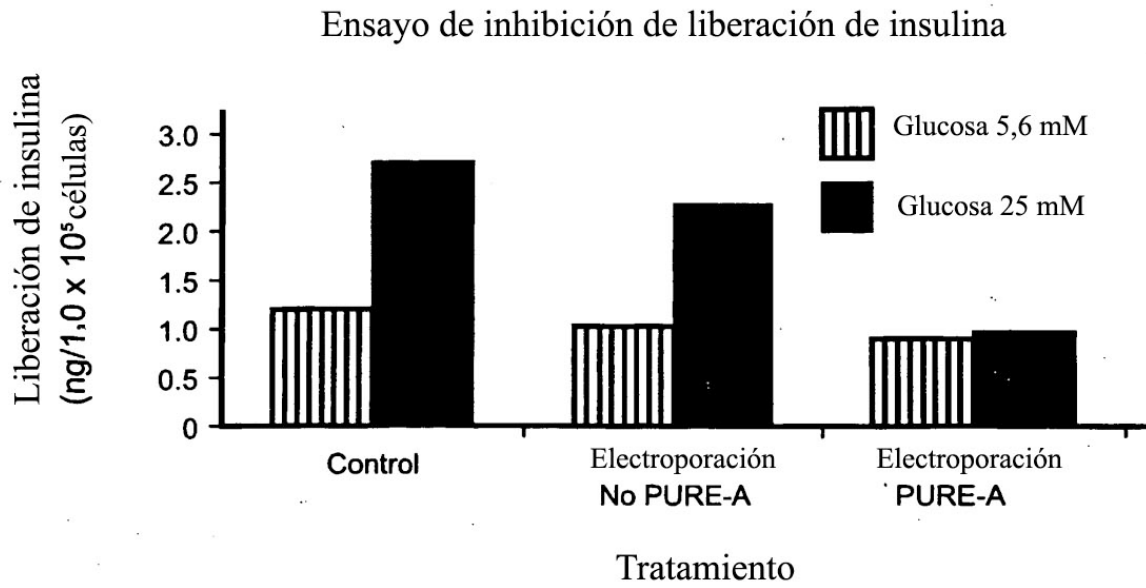


FIG. 3b.

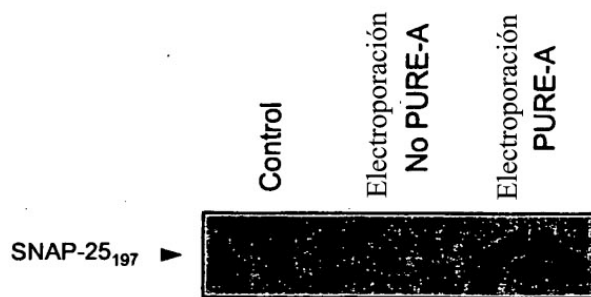


FIG. 4a.

Curva de crecimiento postratamiento de HIT-T15 con PURE-A

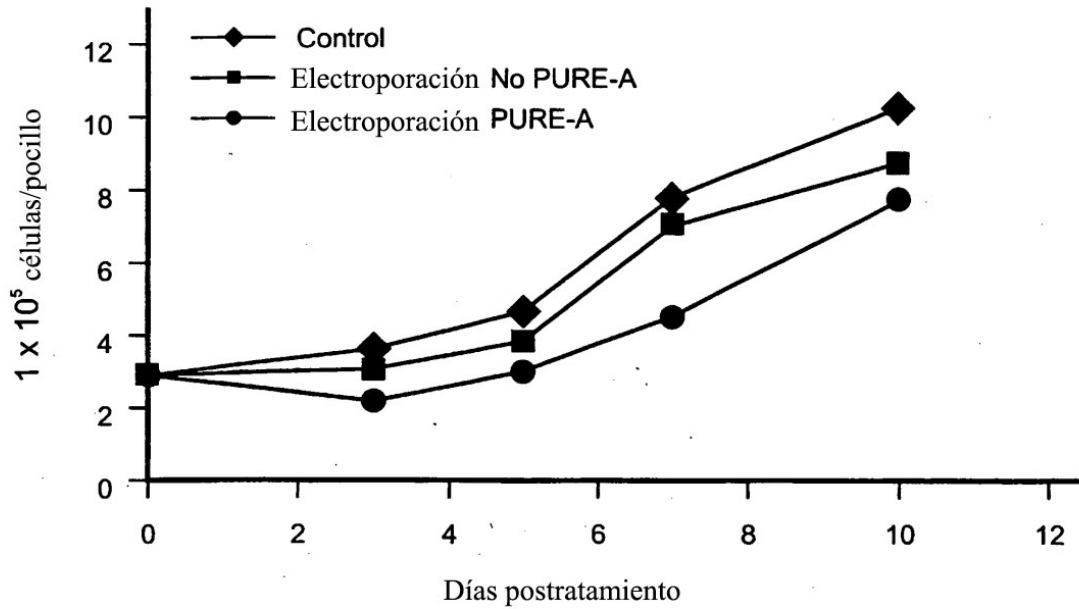


FIG. 4b.

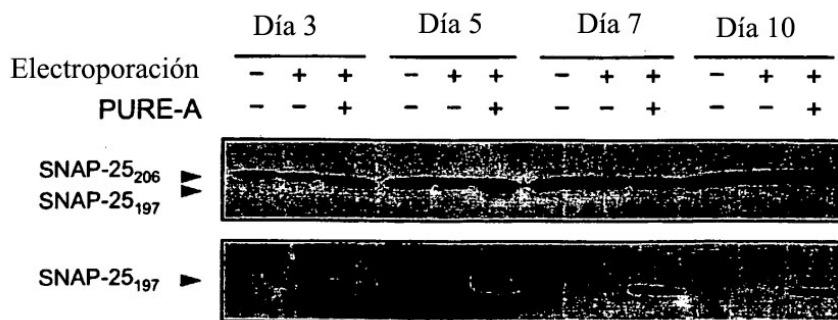


FIG. 5.

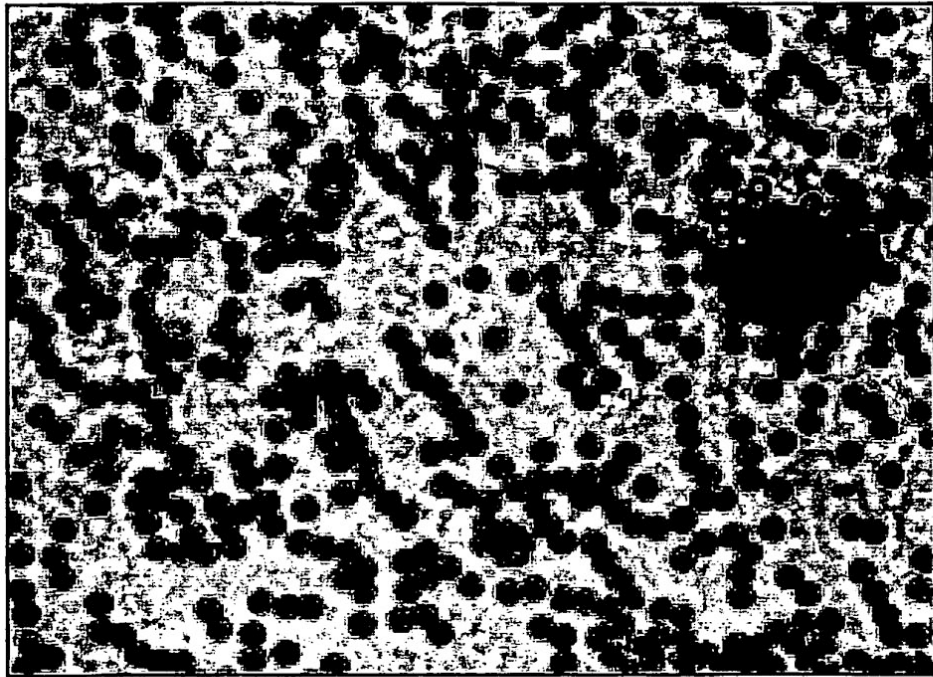


FIG. 6.

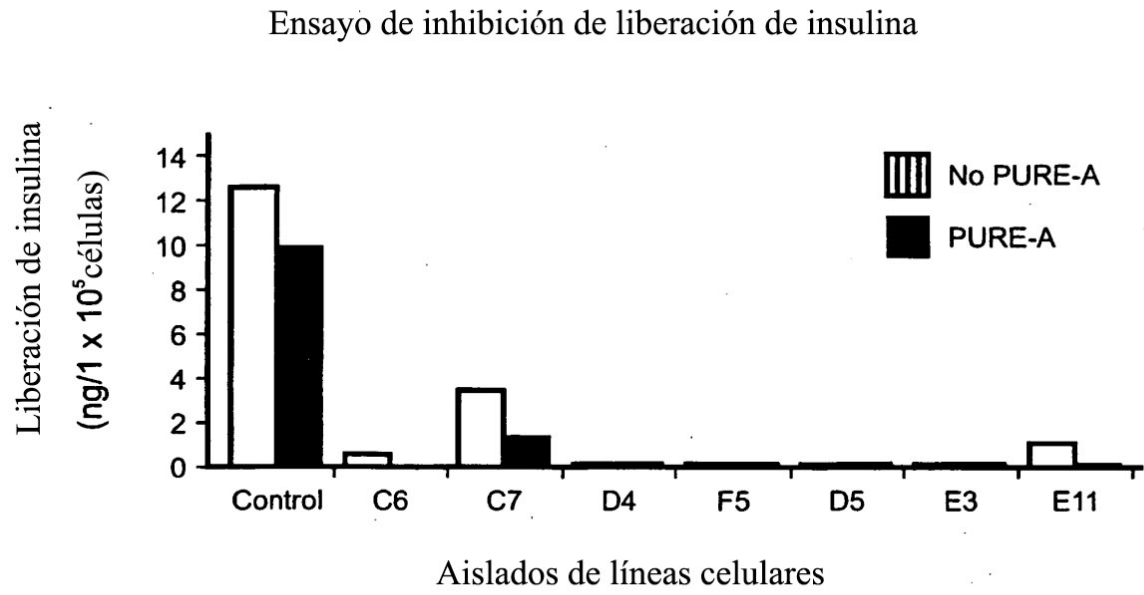


FIG. 7a.

Ensayo de inhibición de liberación de insulina

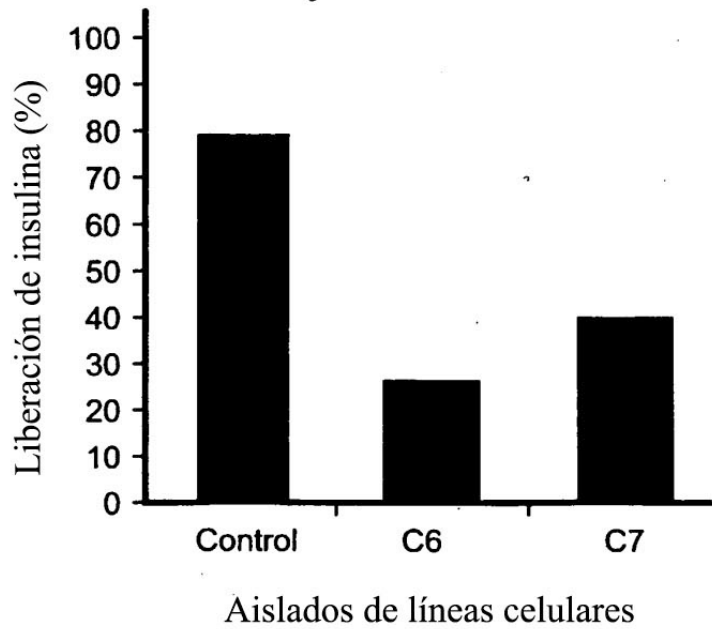


FIG. 7b.

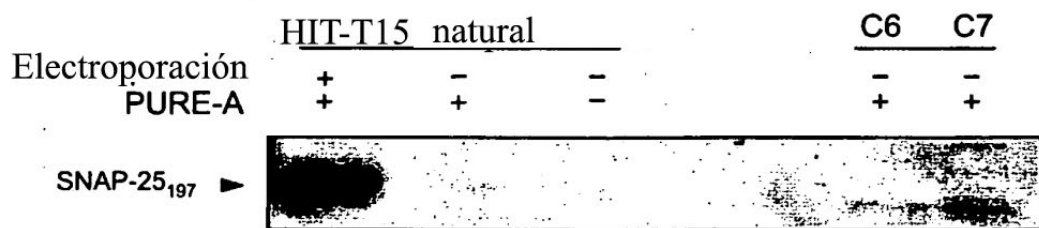


FIG. 8a.

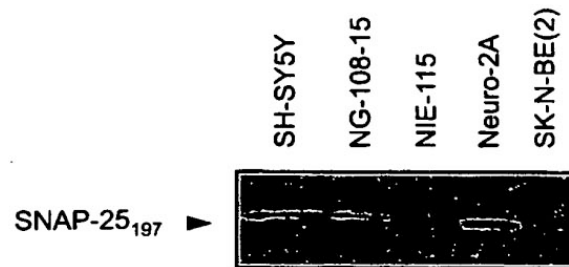


FIG. 8b.

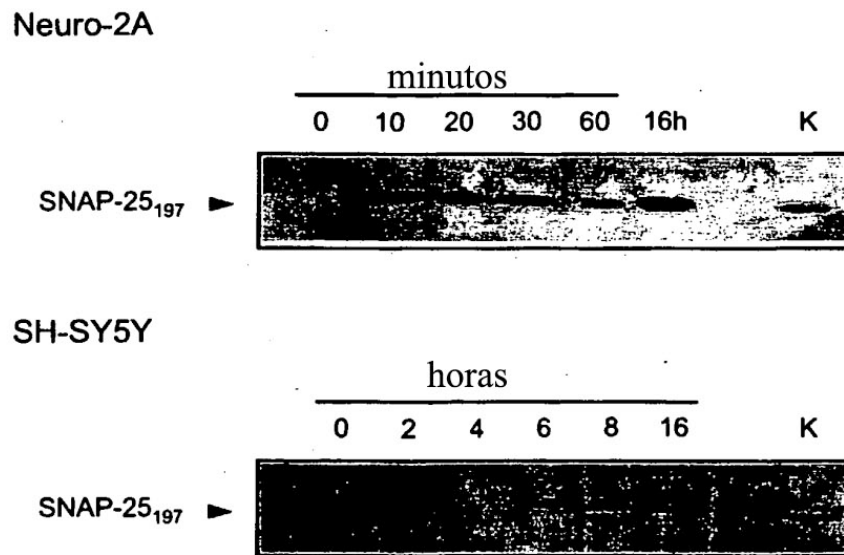


FIG. 8c.

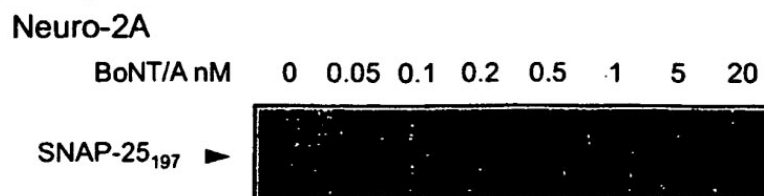


FIG. 9a.

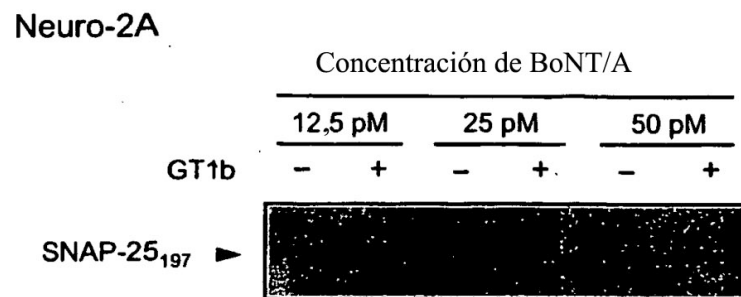


FIG. 9b.

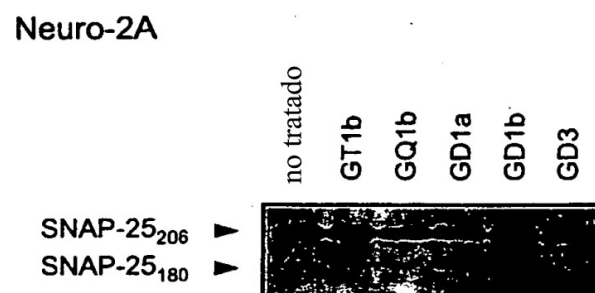


FIG. 10a.

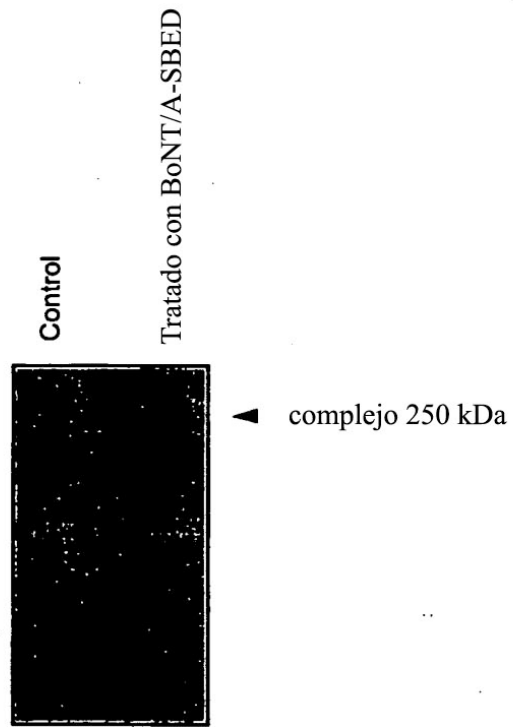


FIG. 10b.

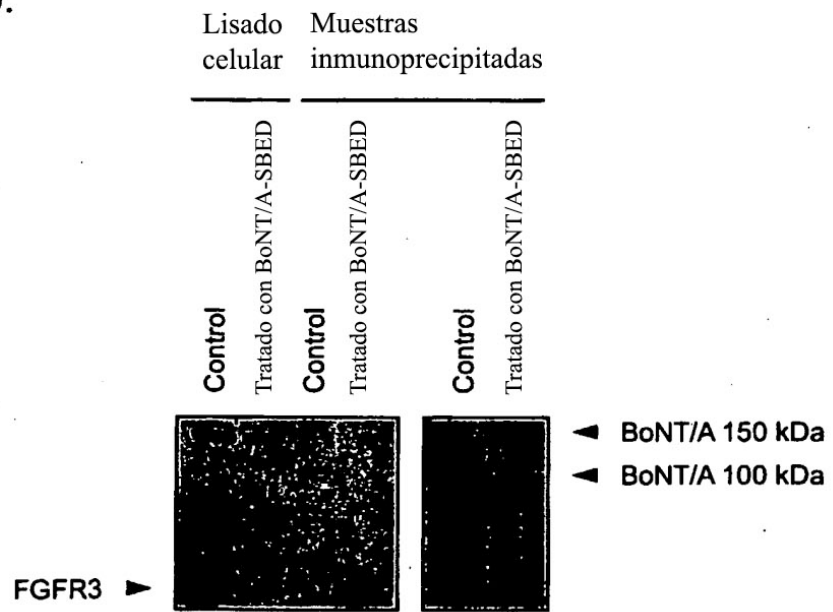


FIG. 11.

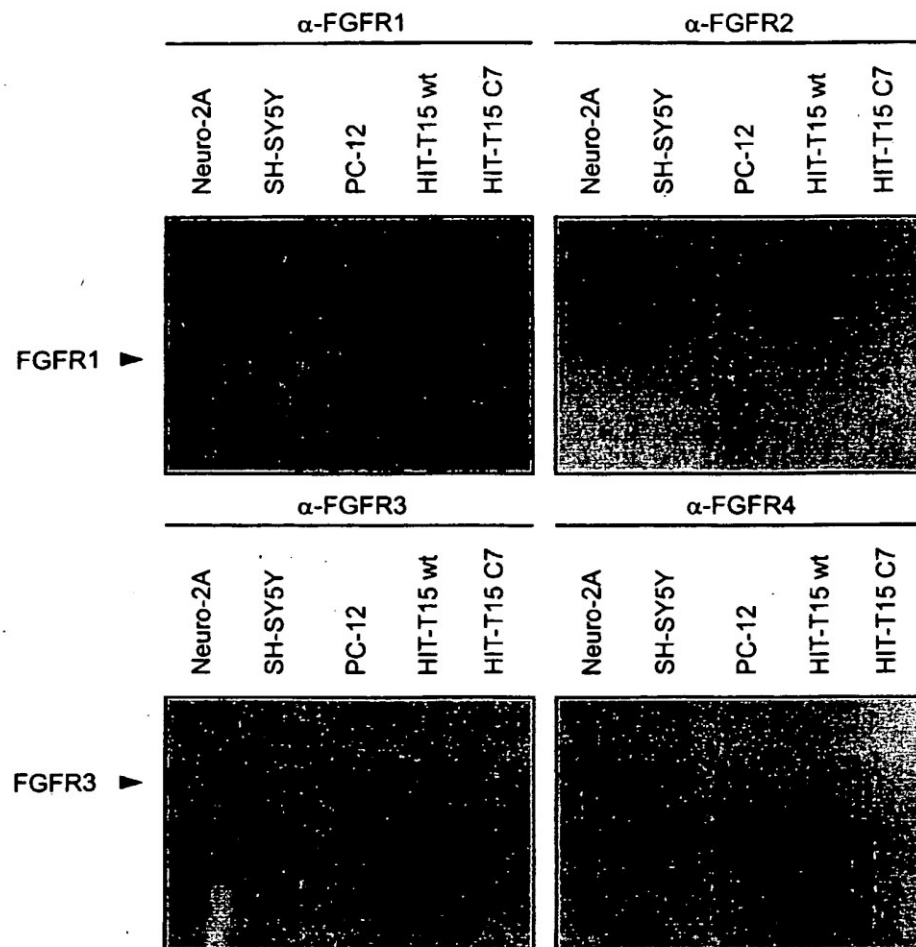


FIG. 12.



FIG. 13a.

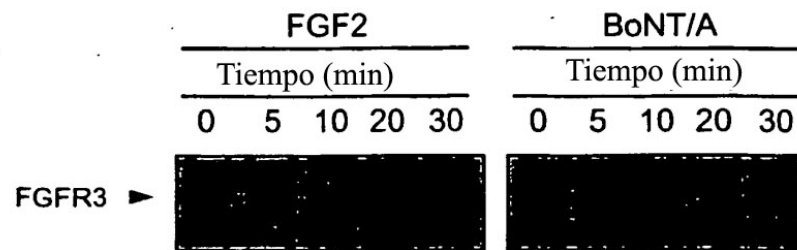


FIG. 13b.

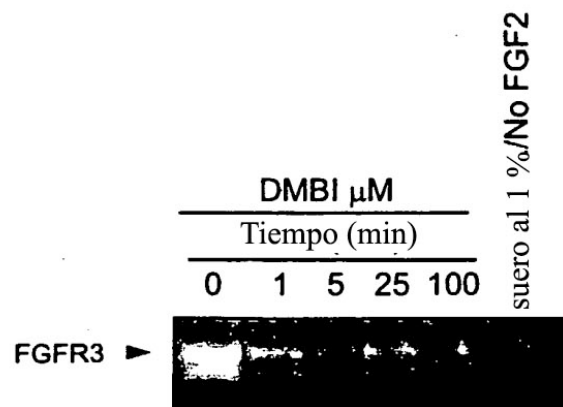


FIG. 13c.

