

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 452**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/71** (2006.01)

**A61K 31/4745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/IB2010/053054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11001413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10734333 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2448964**

54 Título: **Dominio de unión a inhibidor alostérico extracelular procedente de un receptor de tirosina cinasa**

30 Prioridad:

**03.07.2009 EP 09290537**

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

**31.08.2017**

73 Titular/es:

**SANOFI (25.0%)  
54, rue La Boétie  
75008 Paris, FR;  
VIB VZW (25.0%);  
LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW  
(25.0%) y  
VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (25.0%)**

72 Inventor/es:

**CARME LIET, PETER;  
DE SMET, FREDERIK;  
SCHYMKOWITZ, JOOST;  
ROUSSEAU, FRÉDÉRIC y  
HERBERT, CORENTIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

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

ES 2 631 452 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Dominio de unión a inhibidor alostérico extracelular procedente de un receptor de tirosina cinasa

5 La presente invención se refiere a métodos para usar un dominio de unión extracelular para un inhibidor alostérico, en donde dicho dominio de unión se deriva de un receptor de tirosina cinasa de un solo segmento membranario. Más específicamente, la invención se refiere al uso de un dominio extracelular derivado de un receptor de tirosina cinasa, es decir, receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) o receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Se refiere además al uso de este dominio para la identificación de dominios similares en la parte extracelular de otros receptores de  
10 tirosina cinasa, y a un método de cribado para la identificación de un inhibidor alostérico.

Los receptores de la superficie celular representan las dianas de la mayoría de los fármacos (Overington y cols., 2006). Históricamente, los programas de descubrimiento de fármacos han estado dominados por esfuerzos para desarrollar antagonistas que compitan por la unión con ligandos endógenos en sitios ortostéricos. En contraste, los fármacos que se unen a sitios alostéricos, es decir, dominios topográficamente distintos de los utilizados por ligandos ortostéricos (si la diana es un receptor) o sustratos (si la diana es una enzima), y modulan una actividad proteínica han sido más difíciles de identificar. Sin embargo, en los últimos años se ha asistido a un incremento en el número de moduladores alostéricos identificados para canales iónicos regulados por ligandos y receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Christopoulos, 2002; Kenakin, 2010). Sorprendentemente, no se han identificado hasta ahora moduladores de compuestos pequeños alostéricos para tirosina cinasas receptoras (RTK) de factores de crecimiento, a pesar del hecho de que esta superfamilia de receptores es de una inmensa importancia biológica y significación médica, y a pesar del hecho de que los fármacos alostéricos pueden ofrecer claras ventajas terapéuticas sobre los ligandos ortostéricos tradicionales, incluyendo mayores seguridad y/o selectividad. Hasta la fecha, la mayoría de las terapias que se dirigen a RTK se han enfocado bien a anticuerpos monoclonales que reconocen ligandos de factores de crecimiento o bien a compuestos químicos de molécula pequeña que inhiben directamente la actividad de tirosina cinasa de los receptores.  
15  
20  
25

Un área – entre otras – que se puede beneficiar sustancialmente de inhibidores de compuestos pequeños de RTK más eficaces y/o selectivos es el campo de las terapias con fármacos antiangiogénicos. Los agentes antiangiogénicos dirigidos a VEGF prolongan la supervivencia de los pacientes con cáncer, pero su éxito global está restringido por una insensibilidad intrínseca, escape a través de resistencia adquirida y, al menos en modelos preclínicos, estimulación de metástasis. Se ha postulado que una terapia combinada con agentes antiangiogénicos adicionales puede ayudar a vencer estos retos. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2, el primer factor angiogénico identificado, es un atractivo candidato a fármaco. En efecto, la señalización de FGFR se ha relacionado con el cáncer y la enfermedad inflamatoria (Shin y cols., 2006; Eswarakumar y cols., 2005; Malemud y cols., 2007; Carmeliet, 2005), contribuye a la variación angiogénica tumoral (Presta y cols., 2005; Kubo y cols., 2002; Shine y cols., 2006; Lavine y cols., 2006) y rescata la vascularización y la recaída del tumor al tratar con inhibidores de VEGF (Casanovas y cols., 2005). No obstante, la familia de FGF no ha recibido una atención sustancial para el desarrollo de fármacos antiangiogénicos, en parte debido a la redundancia entre los miembros de esta superfamilia de 18 ligandos y 4 FGFR (Eswarakumar y cols., 2005; Beenken y Mohammadi, 2009; Cenni y cols., 2005; Bossard y cols., 2004; Compagni y cols., 2000). Además, los inhibidores selectivos de la tirosina cinasa FGFR no han sido aprobados para uso clínico (Dimitroff y cols., 1999; McDermott y cols., 2005).  
30  
35  
40

La solicitud de patente internacional WO 2005/066211 divulga polipéptidos de FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 y FGFR-4, fragmentos de los mismos y secuencias nucleotídicas que codifican los polipéptidos. El documento divulga las secuencias SEQ ID N° 1 y 2 de la presente solicitud, pero no considera su carácter como dominios frustrados o como sitios de unión alostéricos potenciales para inhibidores de FGFR.  
45

Ivanisevic Ljubica y cols. ["TrkA receptor "hot spots" for binding of NT-3 as a heterologous ligand. "THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 8 JUN 2007, vol. 282, n° 23, 8 de junio de 2007 (2007-06-08), páginas 16754-16763.] han estudiado la interacción de las proteínas factor de crecimiento nervioso (NGF) y neurotrofina-3 (NT-3) con una molécula de TrkA/B quimérica. El estudio se enfoca a cómo la presencia de un ligando macromolecular afecta a la unión de la otra a la quimera TrkA/B. Sin embargo, los autores nunca demuestran claramente la presencia de un sitio alostérico en la Trk quimérica que usan en el estudio, y no se consideran en el artículo ligandos de compuesto pequeño.  
50  
55

### Compendio de la invención

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que, mediante cribado de alto rendimiento combinado con optimización química, se podría identificar el primer inhibidor alostérico de compuesto pequeño oralmente activo de una RTK, a saber, se podría identificar el FGFR. Este compuesto se denomina SSR128129 (abreviado "SSR") (Figura 3).  
60

Según se ilustra mediante el estudio detallado basado en la actividad de SSR, SSR tiene la capacidad de inhibir todos los miembros de una misma familia, actualmente la familia de los FGFR. Según se muestra en los siguientes ejemplos, SSR es capaz de inhibir la actividad de FGFR1 (figuras 4 y 6), la actividad de FGFR2 (figura 8), la actividad de FGFR3 (figura 9) y la actividad de FGFR4 (figura 7). Así, este inhibidor alostérico se une a un sitio alostérico de FGFR conservado evolutivamente, situado en el dominio extracelular del receptor que es compartido por diferentes miembros de TKR. Este sitio conservado está situado en el dominio III del FGFR (figura 11). La unión de SSR a su sitio de unión induce un "antagonismo sesgado". El efecto se confirmó por el hecho de que la unión de SSR al sitio de unión alostérico da como resultado un cambio de conformación en el receptor, especialmente en un dominio frustrado determinado. Debido al antagonismo sesgado, se proporciona un modo de identificar un inhibidor alostérico mediante el uso de una prueba de cribado basada en medidas de rutas de fosfoseñalización según se describe posteriormente. A partir de ahora, SSR es el primer ejemplo de un inhibidor alostérico de una RTK.

La validación de la orientación de este sitio sobre el FGFR y la orientación de sitios similares en otras RTK como VEGFR2 y PDGFR $\beta$  tiene implicaciones prácticas importantes y dará como resultado un beneficio terapéutico significativo.

Los diferentes aspectos de la invención se ilustran en la descripción detallada de la invención y en los siguientes ejemplos.

## Descripción detallada de la invención

Se describe en la presente un sitio de unión alostérico, derivado del dominio extracelular de un receptor de tirosina cinasa. Un sitio de unión alostérico, según se usa en la presente, significa un sitio en el que un inhibidor, preferiblemente un compuesto pequeño, se puede unir, sin provocar una inhibición competitiva de la unión del ligando al sitio de unión al ligando del receptor. Derivado de, según se usa en la presente, significa que el sitio de unión alostérico consiste en una parte del dominio extracelular, pero no incluye el dominio extracelular completo. Preferiblemente, el sitio de unión alostérico tiene entre 10 y 200 aminoácidos de longitud, más preferiblemente entre 10 y 100 aminoácidos, aún más preferiblemente entre 20 y 50 aminoácidos, en donde dichos aminoácidos son parte del dominio extracelular del receptor.

Un compuesto pequeño, según se usa en la presente, es un compuesto de naturaleza no polimérica, preferiblemente con un peso molecular de menos de 1.000 D, más preferiblemente menos de 900 D, más preferiblemente menos de 800 D, más preferiblemente menos de 700 D, más preferiblemente menos de 600 D, aún más preferiblemente de menos de 500 D.

Receptor de tirosina cinasa y tirosina cinasa receptora (RTK) son, en el alcance de esta patente, términos equivalentes de aplicación. "Receptor de tirosina cinasa" se usa para indicar el receptor, mientras que "tirosina cinasa receptora" se usa para indicar más específicamente la actividad de cinasa del receptor. Los receptores de tirosina cinasa son conocidos para el experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, receptores del EGF, factor de crecimiento insulinoide, PDGF, FGF, VEGF, HGF, Trk, AXL, LTK, TIE, ROR, DDR, PKT7, RYK, CCK4, Eph y familias de receptores de MuSK. Preferiblemente, dicho sitio de unión alostérico se deriva del dominio extracelular de un TKR con dominio de Ig, incluyendo AXL, FGFR, MuSK, PDGFR, PTK7, ROR, TIE y VEGFR...; aún más preferiblemente dicho sitio de unión alostérico se deriva de un TKR con un dominio de cinasa dividido en el dominio citoplásmico; una realización preferida de TKR según la invención son los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), o un homólogo, ortólogo o parálogo de los mismos.

"Homólogos" de una proteína abarcan péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas que tienen sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos con relación a la proteína no modificada en cuestión y que tienen una actividad biológica y funcional similar a la proteína no modificada de la que se derivan. "Ortólogos y parálogos" abarcan conceptos evolutivos usados para describir las relaciones ancestrales de los genes. Los parálogos son genes dentro de la misma especie que se han originado a través de la duplicación de un gen ancestral; los ortólogos son genes procedentes de organismos diferentes que se han originado a través de especiación, y también se derivan de un gen ancestral común.

Esta unión alostérica que comprende SEQ ID N° 1 pertenece a la familia de los FGFR, más específicamente al FGFR2. Preferiblemente, dicho sitio del inhibidor alostérico comprende SEQ ID N° 1, aún más preferiblemente consiste en SEQ ID N° 1.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso y los métodos para el uso de un homólogo, un parálogo o un ortólogo de un sitio de unión alostérico. Preferiblemente, la secuencia polipeptídica de estos homólogos, parálogos u ortólogos comparte al menos 70%, 80%, 90%, 95% o más de homología con SEQ ID N° 1.

Como un ejemplo, estos parálogos del sitio de unión alostérico están presentes en la familia de FGFR.

Especialmente, el sitio de unión alostérico según la invención está situado en el dominio III de los FGFR.

Del mismo modo, un sitio de unión alostérico para VEGFR2 está situado en el dominio de Ig 6 del receptor, en una región que incluye la Lisina 609 y la Lisina 648.

5 Un sitio de unión alostérico también está presente en PDGFR $\beta$  y situado en la región situada cerca de la región transmembranaria, especialmente en el dominio de Ig 3., en una región que incluye la Leucina 383 ans la Lisina 387. Preferiblemente, la unión de un inhibidor alostérico al sitio de unión alostérico está induciendo un antagonismo sesgado.

10 Un "antagonismo sesgado", según se usa en la presente, significa que, para un receptor con varias rutas aguas abajo, no todas las rutas están afectadas, o no todas las rutas están afectadas en el mismo grado después de la unión del inhibidor alostérico al sitio de unión al inhibidor alostérico. En una realización preferida, se inhibe al menos una ruta aguas abajo, mientras que al menos otra ruta aguas abajo está inalterada.

15 Preferiblemente, el sitio de unión alostérico según la invención comprende, preferiblemente consiste esencialmente en, aún más preferiblemente consiste en un dominio frustrado.

20 Según se usa en la presente, un "dominio frustrado" significa un dominio proteínico o un fragmento del mismo que no se dirige inequívocamente hacia una conformación estructural; los dominios frustrados son conocidos por el experto en la técnica, y la presencia de dominios frustrados se detecta bien mediante una respuesta inequívoca en un programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas; o bien mediante una contradicción en la predicción entre dos programas de predicción de la estructura secundaria de proteínas. Preferentemente, se detecta por la contradicción en la predicción desde un programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas y la estructura real que se determina mediante un método de detección de la estructura de proteínas tal como cristalización y difracción de rayos X. Como un ejemplo no limitativo, una contradicción puede ser la indicación de una hélice  $\alpha$  con un método y una lámina  $\beta$  con otro método. Las proteínas están mínimamente frustradas; sin embargo, algunos dominios están introduciendo alguna frustración (llamado en la presente "dominio frustrado") y esos dominios tienen a inducir cambios de conformación en la proteína.

25

30 En una realización preferida, dicho dominio frustrado comprende SEQ ID N° 2, preferiblemente consiste en SEQ ID N° 2. Este dominio frustrado pertenece a la familia de FGFR, especialmente a FGFR2.

Otros dominios frustrados se pueden identificar como se indica anteriormente.

35 Se describe en la presente el uso de un sitio de unión alostérico según la invención para inducir un antagonismo sesgado después de la unión de un ligando al sitio de unión del receptor de tirosina cinasa en el que está situado el sitio de unión alostérico. Otro aspecto más de la invención es el uso de un sitio de unión alostérico según la invención para cribar inhibidores de compuesto pequeño procedentes de una biblioteca aleatoria, que se unen a dicho sitio.

40 Otro aspecto más de la invención es un método para la identificación de un sitio de unión a un inhibidor alostérico en el dominio extracelular de un receptor de tirosina cinasa, que comprende el cribado con respecto a la presencia de dominios frustrados en dicho dominio extracelular. Métodos para cribar dominios frustrados son conocidos por el experto en la técnica y un ejemplo de este método se describe en el ejemplo 8. Como un ejemplo no limitativo, dominios frustrados se detectan mediante una respuesta inequívoca en un programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas; preferiblemente mediante una contradicción en la predicción entre dos programas de predicción de la estructura secundaria de proteínas, aún más preferiblemente mediante la contradicción en la predicción desde un programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas y la estructura real que se determina mediante un método de detección de la estructura de proteínas tal como cristalización y difracción de rayos X. Programas para la predicción de la estructura secundaria de proteínas son conocidos por el experto en la técnica; como un ejemplo no limitativo, estos programas son descritos por Rost (2003). Preferiblemente, dicho dominio frustrado está situado en la proximidad de dicho sitio de unión alostérico; más preferiblemente está situado a no más de 20 aminoácidos del límite del sitio de unión, aún más preferiblemente no más de 10 aminoácidos, aún más preferiblemente es adyacente a dicho sitio de unión, aún más preferiblemente está solapado con el sitio de unión, lo más preferiblemente está comprendido en el sitio de unión. Después de la identificación de posibles sitios del inhibidor, el cribado se puede completar mediante la confirmación de la función del posible sitio del inhibidor, al diseñar compuestos tales como moléculas pequeñas, péptidos pequeños, peptidomiméticos, anticuerpos o nanocuerpos que se unen al sitio y de los que se puede probar la función inhibidora alostérica.

45

50

55

60 Otro aspecto de la invención es un método para la identificación de un inhibidor alostérico de compuesto pequeño no polimérico que se une a un sitio de inhibidor alostérico en el dominio extracelular de un receptor de tirosina cinasa según la invención, que comprende la comparación de dos indicadores diferentes inducidos por dos rutas aguas abajo diferentes dependientes de la activación de dicho receptor de tirosina cinasa. Un indicador es cualquier gen, proteína de compuesto que conduzca a una señal detectable y puede ser, como un ejemplo no limitativo, un gen de resistencia a antibiótico, un gen de toxina que dé como resultado la muerte celular, un gen que codifique una proteína fluorescente tal como GFP o un gen que codifique una actividad enzimática tal como beta-galactosidasa, o una proteína se fosforile o desfosforile, se acetile o desacetile o que cambie de conformación. En el caso de un gen

65

repoter, la secuencia codificante se pone bajo el control de un promotor adecuado, es decir un promotor que sea inducido por la unión de un ligando al receptor y la inducción consiguiente de la ruta del indicador; en el caso de una ruta doble, se necesitan dos promotores diferentes. Como un ejemplo no limitativo, comparar la fosforilación de proteínas en presencia o ausencia del inhibidor alostérico dará diferencias en la fosforilación debidas al antagonismo sesgado, y estas diferencias en la fosforilación se pueden usar como indicador.

En una realización preferida, la identificación de un inhibidor alostérico de una RTK se puede llevar a cabo al realizar una prueba de cribado que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto un sitio de unión alostérico de una RTK con un compuesto candidato a inhibidor alostérico
- b) medir los cambios en al menos dos rutas aguas abajo dependientes de la activación/inhibición de dicho receptor de tirosina cinasa.
- c) comparar cambios en el estado de al menos un indicador para cada una de las al menos dos rutas aguas abajo diferentes dependientes de la activación/inhibición de dicho receptor de tirosina cinasa.

en donde un inhibidor alostérico se identifica cuando, en presencia de un ligando que se une al dominio de unión a ligando del receptor, al menos una ruta aguas abajo se inhibe mientras que al menos otra ruta aguas abajo permanece inalterada. El cambio en el estado de un indicador depende del indicador usado, y puede ser, como un ejemplo no limitativo, un cambio en la fosforilación de una proteína indicadora, o la variación de no inducido a inducido (o viceversa) de un gen. Preferiblemente, dicho cambio en el estado es un cambio en el estado de fosforilación.

Preferiblemente, los cambios en las rutas aguas abajo se realizan mediante la medida de los cambios en las rutas de fosfoseñalización, incluyendo las rutas de señalización de ERK1/2 y PLC $\gamma$

En otra realización, un modulador alostérico de FGF-R se puede identificar usando un cribado de afinidad basado en SEC-LC/MS según se describe posteriormente:

La metodología SEC-LC/MS es una técnica analítica usada para el cribado de afinidad que consiste en un sistema bidimensional acoplado en línea: una cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a una cromatografía de líquidos de alta resolución para el aislamiento seguido por una ionización por electropulverización – espectrometría de masas de tiempo de vuelo para la detección.

El método se basa en la capacidad de algunos compuestos para interactuar con polipéptidos (incluyendo péptidos, dominios proteínicos o proteínas de longitud completa) solubles. Después de mezclar un conjunto de compuestos pequeños con el péptido de interés, el complejo péptido-ligando induce una variación de masa que permite la separación de compuestos pequeños no unidos y unidos mediante cromatografía de exclusión por tamaños. A continuación, el complejo se disocia y los aglutinantes se separan del péptido y se detectan usando una LC/ESI-TOF de alta resolución para la medida exacta de la masa (por ejemplo con un Waters LCT Premier Mass Spectrometer). Un algoritmo de deconvolución permite la identificación de moléculas unidas a partir del análisis de detección de masas.

Para la identificación de moduladores alostéricos de compuesto pequeño de FGFR, esta tecnología se puede aplicar al dominio extracelular de diferentes FGF-R, bien naturales o bien mutados. La forma natural permite la detección de todos los aglutinantes para el dominio extracelular. Alternativamente, los moduladores alostéricos se pueden cribar al usar una forma "abierta" de la hélice de FGF-R2 cercana al sitio de unión a SSR. Dicha forma "abierta" se puede obtener mediante las mutaciones Tyr328Arg-Ile329Lys que estabiliza una hélice alfa, permitiendo de ese modo la sensibilización a la unión a SSR. A continuación, el FGF-R2 mutado se usa en el cribado, en lugar del WT FGF-R2. Una estrategia similar se puede usar para cribar FGF-R1, -R3 o -R4 con mutaciones en aminoácidos correspondientes a Tyr328 e Ile329 en FGF-R2. La forma mutada en Tyr328Asp (FGF-R2) u otros FGF-R con una mutación en las posiciones correspondientes se puede usar como control. En efecto, SSR no se une al FGF-R2 que está mutado en Tyr328Asp cerca de un bolsillo hidrófobo. Por lo tanto, esta forma mutada se puede usar para descartar parte de los compuestos que no interactúan con el bolsillo elegido como diana en FGF-R2.

En todos los casos, esta estrategia conduce a la identificación de compuestos pequeños capaces de unirse en el bolsillo diana del péptido de interés. En una segunda etapa, se tiene que evaluar el efecto sobre la señalización en la célula. Basándose en las rutas de fosfoseñalización identificadas con el "estuche de matrices de fosfoquinasas humanas" Proteome Profiler™ Array de R&D Systems, los moduladores alostéricos se puede comprobar mediante ELISA (sobre extractos de proteína celular o directamente sobre células) con respecto a su capacidad para inhibir el efecto de FGF-2 sobre HUVEC al nivel de cinasa de fosforilación (sobre PYK2, eNOS, p53, c-jun, AKT, CREB, Erk1/2) sin inhibición de cinasas inalteradas detectadas con el perfilador de proteomas.

5 Se puede seguir un enfoque similar para otras RTK: después de la identificación de uno o más dominios frustrados en el dominio extracelular del receptor, dicho dominio frustrado se puede usar en un enfoque de SEC-LC/MS para identificar aglutinantes en la región del dominio frustrado. El efecto del aglutinante sobre la ruta de señalización se puede probar a continuación usando el enfoque del fosfomapa, según se describe anteriormente, o cualquier otro sistema indicador de la ruta.

Se describe en la presente un compuesto compuesto pequeño que se une a un sitio de unión alostérico, también llamado "inhibidor alostérico" según la invención, y/o identificado con un método según la invención.

10 "Compuesto" significa cualquier compuesto químico o biológico, incluyendo moléculas, péptidos, peptidomiméticos, proteínas, anticuerpos, carbohidratos, ácidos nucleicos o derivados de los mismos orgánicos e inorgánicos simples o complejos.

### Breve descripción de las figuras

15 Figura 1: A/ El experimento de PCR cuantitativa sobre HUVEC muestra solamente la expresión de FGFR1 y FGFR4. B/ El análisis de RT-PCR identificaba las isoformas FGFR1 $\beta$  y FGFR4. FGFR1 está bajo el formato de la variante IIIc (C).

Figura 2: Células BaF/3 transfectadas con FGFR1 $\beta$ IIIc-hMpl son capaces de proliferar cuando se activa el FGFR insertado. Solamente FGF4 (A) es capaz de inducir FGFR1 $\beta$ IIIc mientras que FGF19 no lo es (B).

Figura 3: Representación del compuesto SSR

20 Figura 4: Estudio sobre la actividad de SSR sobre la proliferación de células endoteliales. A/ solamente FGF2 y FGF4 estimulan la proliferación de HUVEC indicando que FGFR1 conduce la proliferación en estas células. B/ SSR inhibe la proliferación de HUVEC inducida por FGF2 indicando el antagonismo de FGFR1 por SSR. C/ En células endoteliales de almohadilla fad de rata (RFPEC) transfectadas con FGFR1, FGF2 inducía la autofosforilación de FGFR1 que es inhibida solo parcialmente con SSR incluso en dosis altas. D/ Esta inhibición no se debe a un efecto competitivo de SSR sobre la unión a FGF2 en FGFR1 transfectado con PAEC o en HUVEC.

Figura 5: A/ Unión de un FGF1 lumio Marcado fluorescente FGF1 (FGF1-lumio) a un ECD purificado de FGFR2 sin el marcador Fc (FGFR2 $\Delta$ 123), al medir la velocidad de volteo como un parámetro de anisotropía. No se observa competición directa entre SSR y FGF1-lumio. B/ SSR no es capaz de inhibir la multimerización de FGFR2 o la dimerización de c/ FGF2.

30 Figura 6: Estudio sobre la actividad de SSR sobre la migración quimiotáctica de células endoteliales. A/ sólo FGF2 y FGF4 estimulan la migración de HUVEC indicando que FGFR1 conduce la proliferación en estas células. B/ SSR inhibe la migración quimiotáctica de HUVEC inducida por FGF2 correspondiente a su efecto antagónico sobre FGFR1.

35 Figura 7: Estudio sobre la actividad de SSR sobre angiogénesis in vitro de células endoteliales. A/ solamente FGF2 y FGF19 estimulan la angiogénesis de HUVEC indicando que FGFR4 controla esta etapa de diferenciación en estas células. B/ SSR inhibe la angiogénesis in vitro de HUVEC inducida por FGF2 correspondiente a su efecto antagónico sobre FGFR4.

40 Figura 8: Estudio sobre la actividad de SSR sobre la proliferación y la migración de PANC02. Las células PANC02 proliferan (A) o migran (B) bajo estimulación con FGF7 con o sin VEGF, sugiriendo una dependencia de FGFR2IIIb del sistema. SSR inhibe la proliferación de PANC02 inducida por FGF7 y la migración celular inducida por FGF7+VEGF, mostrando su capacidad para inhibir FGFR2IIIb.

45 Figura 9: Estudio sobre la actividad de SSR sobre la proliferación de células de mieloma B9. A/ FGF1 induce la proliferación de células de mieloma B9 a través de FGFR3 y SSR inhibe esta estimulación, indicando que SSR es capaz de bloquear FGFR3. B/ No obstante, SSR no es capaz de inhibir la proliferación de células B9 transfectadas con un mutante de FGFR3 autoactivo (el dominio de cinasa está fosforilado constitutivamente). Estos resultados indican un efecto extracelular de SSR.

Figura 10: ensayo de migración de HUVEC en el que SSR es incapaz de inhibir significativamente la migración celular inducida por diversos factores de crecimiento tales como IGF, PDGF-BB, EGF o PIGF. SSR es específico para FGFR y sólo bloquea la migración de HUVEC inducida por FGF.

- Figura 11: Estudios de NMR que muestran la unión a SSR sobre el dominio III de FGFR. A/ Análisis por 1D- y STD-NMR de la unión a SSR sobre el dominio extracelular de FGFR1. No se observa saturación con TNFR1 $\alpha$  de control. B/ Un estudio de 1D-NMR de la unión a SSR sobre diferentes dominios de FGFR1 demuestra que los espectros obtenidos con longitud completa de FGFR1 y con el dominio II de FGFR1 son similares, sugiriendo un sitio de interacción en el dominio III. C/ Valoración isotérmica calorimétrica que muestra la capacidad para que SSR se una sobre el dominio extracelular de FGFR2 y FGFR3 (D).
- Figura 12: Estudios de NMR (A, C) y ITC (B) que demuestran que SSR no es capaz de interactuar con FGF1 (A, B) ni FGF2 (C). D/ No se observa interferencia en la unión a SSR sobre FGFR1 después de la adición de octasulfato de sacarosa (SOS), un mimético de heparina, confirmando que SSR no interactúa con el sitio de unión a heparina de FGFR1.
- Figura 13: El modelado informático y la mutagénesis identifican un sitio de unión alostérico para SSR cerca del aminoácido Y328. Los experimentos de ITC sobre el dominio extracelular de WT FGFR2 (A) muestran una interacción entre SSR y FGFR2. Esta unión fallaba cuando las medidas se realizan con mutante Y328D (B) confirman que la mutación Y328D hace a FGFR2 insensible a la unión a SSR.
- Figura 14: Las medidas infrarrojas con transformada de Fourier (FTIR) de (A) FGFR2 $\delta$ 23-WT, (B) FGFR2- $\delta$ 23-His, (C) FGFR2- $\delta$ 23-Tyr, (D) FGFR2- $\delta$ 23-H/T (mutante doble H295L/Y328D) purificados, sin o con 100  $\mu$ M de SSR (línea negra y gris, respectivamente) identificaban un cambio de conformación tanto en WT como en el mutante His295L mientras que la mutación Y328D hace al FGFR2 insensible para este cambio.
- Figura 15: Análisis de transferencia Western de Erk1/2 activada, después de la estimulación con FGF2 (0,5 ng/ml durante 5 min) de células HEK293 transfectadas establemente con FGFR2-WT o -Y328D de longitud completa. El valor de IC50 definido por densitometría (media  $\pm$  eem; tres experimentos independientes) muestra que el receptor mutante FGFR2-Y328D (B) es aproximadamente 5 veces menos sensible a la inhibición por SSR en comparación con FGFR2-WT (A).
- Figura 16: A/ Análisis de transferencia Western del efecto de SSR en comparación con el inhibidor de tirosina cinasa FGFR SU5402 sobre células HEK transfectadas con FGFR2 estimuladas con FGF2. SU5402 inhibe la fosforilación de PLC $\gamma$ , FRS2 y Erk1/2 mientras SSR no inhibe la ruta PLC $\gamma$ , indicando un antagonismo sesgado por SSR (B).
- Figura 17: Análisis de transferencia Western (A) del efecto de SSR sobre la fosforilación de AKT inducida por FGF2 en HUVEC con la correspondiente gráfica de cuantificación (B). C/ Este efecto también es cuantificable con un ELISA sobre células dirigido contra fosfo-AKT (Ser473). D/ Este efecto es independiente de la incapacidad de SSR para competir con la unión a FGF sobre FGFR.
- Figura 18: Identificación de zonas frustradas putativas en el receptor VEGF-R2 usando el programa de software AGADIR y análisis de mutaciones. (A) Algunas regiones que son propensas a sufrir cambios estructurales (p. ej., transiciones de lámina  $\beta$  a hélice  $\alpha$ ) se han identificado por. (B) Se han elegido dos lisinas (K609 y K648) para la mutación en aspartato debido a su proximidad al dominio transmembranario y su impacto más negativo sobre la propiedad de helicidad después de la mutación.
- Figura 19: Identificación de zonas frustradas putativas en el receptor PDGF-R $\beta$  usando el programa de software AGADIR y análisis de mutaciones. Las mutaciones Lisina387 en Aspartato y Leucina383 en aspartato parecen tener el impacto más negativo sobre la propiedad de helicidad.
- Figura 20: Representación esquemática de la activación de la rutas de señalización de receptores VEGF-R2 y PDGF-R $\beta$  a través de Erk1/2 y PLC $\gamma$ . (A) señalización de VEGFR2 después de la estimulación con VEGF y (B) señalización de PDGF-R $\beta$  después de la estimulación con PDGF.
- Figura 21: Detección de la fosforilación Erk1/2 en células HEK293 que sobreexpresan formas silvestres o mutadas de receptores VEGF-R2 o PDGF-R $\beta$  usando un ensayo de transferencia Western o Surefire. (A) un ratón silvestre para VEGF-R2 y mutado en K609D o K648D se transfectaron establemente en células HEK293. Después de inanición y estimulación sin (0) o con (+) VEGF de ratón, la fosforilación de Erk1/2 se detecta mediante transferencia Western. (B) representación esquemática del ensayo Surefire para detectar la fosforilación de Erk1/2 (esquema de la izquierda) o PLC $\gamma$  (esquema de la derecha) sobre extractos proteínicos. (C) Dosificaciones de Alphascreen surefire de Erk1/2 total o fosforilada en células HEK293 transfectadas con PDGFR $\beta$  después de la estimulación con 10% de FBS, 1 o 50 ng/ml de PDGF-BB o sin estimulación como control (0).

## Ejemplos

### Materiales y métodos para los

#### Ensayo de unión por STD-NMR

5 El dominio extracelular (ECD; aminoácidos: 39-358) del gen de FGFR1 humano (P11362) se amplificó por PCR y se clonó en el vector de *E. coli* pETTEV (con un marcador de His N-terminal seguido por un sitio de escisión de TEV proteasa), usando los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI. Para la producción de proteínas, el plásmido resultante (pET FGFR1 D1 D2D3) se transformó en *E. coli* BL21(DE3) (Novagene). Las células se hicieron crecer a 37°C hasta que la OD<sub>600</sub> alcanzaba 0,6 y la producción de proteínas recombinantes se indujo al añadir 1 mM de IPTG (isopropil-  
 10 b-D-tiogalactopiranosido). Después de 4 horas de inducción, las células se recogieron y se almacenaron a -80°C hasta el uso. La pella celular (1 l de cultivo) se descongeló y se resuspendió en 50 ml de tampón 1 (20 mM de Tris/HCl, pH 7,5, 200 mM de NaCl) que contenía lisozima (2 mg) y 40 U de benzonasa (Merck). Las células se rompieron mediante ultrasonidos, los cuerpos de inclusión (IB) se sedimentaron mediante centrifugación (15.000 g, 20 min, 4°C), y la pella resultante se lavó dos veces con tampón 1. La pella de IB se disolvió en 20 ml de tampón de desnaturalización (6 M de guanidina-HCl, 20 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM de NaCl) durante 40 minutos a  
 15 temperatura ambiente. El residuo insoluble se retiró mediante centrifugación (30.000 g, 30 min) y el sobrenadante se cargó en una columna Ni-NTA (Qiagen) preequilibrada con tampón A siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ECD de FGFR1 se eluyó de la columna usando tampón de desnaturalización con 500 mM de imidazol. Las fracciones que contenía ECD se reunieron y se replegaron mediante la dilución instantánea de la proteína solubilizada (factor de dilución 1:30) en 50 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 250 mM de NaCl, 0,5 M de L-arginina, 2 mM de EDTA, 0,02% de azida seguido por incubación con agitación suave durante 24 h a 4°C. La mezcla de repliegue se centrifugó a 30.000 g durante 20 min, se concentró a través de una membrana YM10 (concentración final de proteína 1 mg/ml) en una cubeta agitada Amicon, se dializó frente a 25 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM de EDTA, 0,02% de azida, se aplicó a una HiTrap Heparin HP 5ml (GE Healthcare) y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 2  
 20 M de NaCl. La purificación final del ECD de FGFR1 se alcanzó mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Hi Load 26/60 75 pG (GE Healthcare) equilibrada con 25 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM de NaCl, 25 mM de L-arginina, 2 mM de EDTA, 0,02% de azida. FGF1 (aminoácidos: 16-155) y FGF2 (aminoácidos 9-155) y TNF-R1 $\alpha$  se expresaron y se purificaron. La integridad estructural del ECD de FGFR1 se demostró por su capacidad para unirse a la columna de heparina (véase anteriormente) y mediante la formación de un complejo con FGF1. La formación del complejo se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y análisis posterior  
 30 con SDS-PAGE.

Todos los experimentos de STD- y 1D-NMR se llevaron a cabo en un espectrómetro BRUKER DRX600 de tres canales y uno BRUKER DRX800 de cuatro canales a la temperatura estándar de 25°C (298K) y se refirieron al patrón interno sal sódica de 3-trimetil-2,2,3,3-tetradeuteropropionato (TSP). Típicamente, las muestras de NMR  
 35 contenían 0,5 ml de proteína (20-300 mM) en 25 mM de Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM de NaCl, 25 mM de L-arginina, 2 mM de EDTA, 0,02% de azida (en 95% de H<sub>2</sub>O/5% de D<sub>2</sub>O). Para las medidas por 1D STD NMR de ligando proteínico, los espectros se registraron con 1 mM de ligando SSR128129E (100 mM de solución madre en DMSO) y 40 mM de proteína con irradiación RF de 2s débil sobre resonancias de metilo de proteínas separadas. La supresión del agua se llevó a cabo usando la secuencia estándar Bruker WATERGATE 3-9-19. Los datos de NMR se procesaron usando el software Bruker program xwin NMR.  
 40

#### Medidas calorimétricas de valoración térmica (ITC)

Todos los experimentos calorimétricos se realizaron a 30°C con un calorímetro de valoración VP-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA) según se describe previamente<sup>45</sup>. Las valoraciones implicaban la adición de partes alícuotas de 10  $\mu$ l de 1,25 mM de SSR a través de agitador giratorio-jeringa a la cubeta de solución que contenía 1,407 ml de los  
 45 10 - 20  $\mu$ M de la proteína interactiva (es decir FGFR2 <sup>$\delta$ 123</sup>, FGFR2 <sup>$\delta$ 23</sup> y sus mutantes y subdominios descritos, FGFR3 <sup>$\delta$ 123</sup>, FGF1, FGF2 y folistatina (como control negativo) a intervalos de 4 min. Se mantuvo una velocidad de agitación constante de 300 rpm y los datos se ajustaron a modelo de un solo sitio no interactivo estándar suministrado por MicroCal, con n fijado como 1,0. Todas las medidas se realizaron en 10 mM de HEPES pH 7,2, 150 mM de NaCl, y las proteínas se purificaron como se describe previamente (Pellegrini y cols., 2000). La mutagénesis se realizó usando el 'estuche de mutagénesis dirigida al sitio' (Stratagene).  
 50

#### Medidas de infrarrojo con transformada de Fourier

Las medidas de infrarrojo con transformada de Fourier se realizaron usando un espectrómetro de FT-IR Bruker Tensor 37 equipado con una celdilla de flujo AquaSpec. El compartimento de muestra se termostatóizó hasta 25°C. Se promediaron 100 espectros para una buena relación de señal a ruido. Las proteínas se purificaron como se describe anteriormente. Inmediatamente después de la filtración en gel, las proteínas se dializaron durante la noche en la misma preparación de tampón (10 mM de Hepes pH 7,2, 150 mM de NaCl) en presencia o ausencia de SSR. Se usaron muestras de tampón de diálisis para sustraer la señal de fondo. Los análisis se realizaron usando el  
 55

paquete de software OPUS, proporcionado por Bruker. La interpretación de los resultados se realizó como se describe {Barth, 2002 #60}.

#### Estudios de transfección de HEK293 y fosforilación de Erk1/2, PLCy y FRS2

5 Células HEK293 se transfectaron bien transitoriamente o bien establemente (usando FuGENE 6, Roche) con hFGFR2IIIcα o hFGFR2IIIcα-Y328D clonado en pcDNA3 (Invitrogen). Las células transfectadas establemente se hicieron crecer en medio que contenía G418 (400 µg/ml). Antes de la estimulación, las células se sometieron a inanición durante la noche en DMEM (0% de suero) y se preincubaron con SSR128128E a la concentración requerida. Posteriormente, las células se estimularon con FGF2 (concentración entre 0,5-10 ng/ml) durante 5 min a 37°C con o sin SSR o SU5402 a 1 µM. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo que contenía inhibidores de fosfatasa (Roche), las células se sometieron a lisis en tampón de RIPA (Tris 30 mM de HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton-X, 0,5% p/v de desoxicolato, que contenía inhibidores de fosfatasa y proteasa según se describe por el fabricante (Roche)). Los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min y los sobrenadantes se recogieron. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida Novex (Invitrogen, Carlsbad, CA) y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia). Después de la incubación con 5% de leche desnatada en polvo en PBS, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: fosfo-ERK1/2 (CST:9101), fosfo-FRS2 (CST:3861), fosfo-PLCy (CST:2821) y FGFR2 (F0300, Sigma).

#### Proliferación de células BaF/3 transfectadas con FGFR

20 La construcción de células BaF/3 usadas en este experimento se ha descrito con detalle en la solicitud WO2007/080325.

#### PCR cuantitativa en tiempo real

25 Se aisló ARN total de HUVEC usando el reactivo Trizole (Invitrogen, USA) y el estuche RNeasy (Qiagen, Alemania), a partir del cual se preparó posteriormente ADNc usando el estuche de transcripción inversa Quantitect (Qiagen, Alemania). Se diseñaron grupos de cebadores y sondas MGB TaqMan® marcadas con colorante FAM™ (Eurogentec, Bélgica) para FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 y TBP humanos y se llevaron a cabo reacciones de PCR en un sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 (ABI, Alemania). Cada muestra se analizó por triplicado junto con patrones específicos y sin controles de plantilla. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, 20X Assays-on-demand™ Gene Expression Assay Mix. Los cálculos del número de copias inicial de ARNm en cada muestra se realizaron según el método del umbral del ciclo (CT). Los números de copias de FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ARNm se normalizaron usando los niveles de ARNm de TBP.

#### Medidas de la fosforilación de FGFR1

35 Células endoteliales de almohadilla grasa de rata, establemente transfectadas con hFGFR1IIIcα-hemaglutinina, se hicieron crecer hasta 80-90% de confluencia y se agotaron en suero (0,5% de FBS) durante 24 h. La estimulación se realizó durante 5 minutos con FGF2 a 2 ng/ml en combinación con SSR o DMSO (como control). Los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min, y los sobrenadantes se recogieron. Las proteínas marcadas con HA se inmunoprecipitaron mediante la incubación de los lisados celulares durante la noche a 4°C en presencia de anticuerpos anti-HA conjugados a agarosa. Los complejos inmunitarios se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de lisis; las proteínas se eluyeron a través de incubación con 50 µl de 2x tampón de muestra de SDS y ebullición. Las proteínas se separaron sobre geles de poliacrilamida Novex (Invitrogen, Carlsbad, CA) y posteriormente se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia). Después de la incubación con 5% de leche desnatada en polvo en PBS, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: pFGFR (CST: 3471) y FGFR1 (CST: 3472).

#### Medidas de anisotropía

45 Para determinar si SSR inhibe la unión de FGF1 a su bolsillo de unión, se purificó todo el dominio extracelular de FGFR2 sin marcador de Fc (FGFR2<sup>δ123</sup>) y se midió la velocidad de volteo (como un parámetro de la anisotropía) de un FGF1 lumio Marcado fluorescente FGF1 (FGF1-lumio; concentración constante de 1 µM) en presencia de concentraciones variables de FGFR2<sup>δ123</sup> sin (azul) o con (rojo) SSR (1 mM). Cuando se añadía FGFR2<sup>δ123</sup> a FGF1-lumio, la velocidad de volteo del complejo ligando/receptor era menor que la FGF-lumio solo, debido a su mayor tamaño. Un gran exceso molar (1.000 veces) de SSR no alteraba la velocidad de volteo del complejo, confirmando que SSR no desplaza FGF de FGFR.

## Proliferación de HUVEC

Se recogen células HUVEC confluentes y se siembran  $5 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ l de RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014) con 0,5% de FCS (Hyclone, SH30070.03), 2 mM de glutamina, aminoácido no esencial en MEM 1x (Gibco, 11140-035), piruvato sódico en MEM 1x (Gibco, 11360-039) por pocillo en placas de 96 pocillos revestidas con colágeno (Beckton Dickinson, 354650) durante la noche. A continuación, el medio se retira y se reemplaza por 50  $\mu$ l de medio que contiene 2x FGF2 (R&D, 234-FSE-025), FGF4 (R&D, 235-F4-025) o FGF-19 (producción interna) y 50  $\mu$ l de 2x SSR (200 o 600 nM). Las células se incubaron en una cámara de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 días y la proliferación se evalúa al cuantificar el contenido de ATP con 100  $\mu$ l del estuche "Cell Titer Glo Luminescent cell viability" (Promega, G7571).

## 10 Migración quimiotáctica de HUVEC

Se recogen células HUVEC confluentes y se resuspendieron en RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014) sin FCS, 2 mM de glutamina, aminoácido no esencial en MEM 1x (Gibco, 11140-035), piruvato sódico en MEM 1x (Gibco, 11360-039) a  $0,8 \times 10^6$  células/ml. Se distribuyen 250  $\mu$ l de solución celular con 4x SSR en la cámara superior de BD Biocoat Angiogenesis System de 24 pocillos para la migración de células endoteliales (BD Biocoat, 354144) y 750  $\mu$ l de medio en la cámara inferior con FGF2 (R&D, 234-FSE-025), FGF4 (R&D, 235-F4-025) o FGF-19 (producción interna) a 67 ng/ml. Las placas se incuban 22 h a 37°C en una cámara de CO<sub>2</sub>. A continuación, se retira la inserción de la placa y se pone en una nueva placa de 24 pocillos (Falcon, 353504) que contiene 500  $\mu$ l de calceína (Molecular probes, C-3100) durante 90 min. Entonces, las células migradas son fluorescentes y la migración se mide mediante un luminómetro con lectura descendente después de la excitación a 485 nm y la emisión a 535 nm.

## 20 Angiogénesis de HUVEC in vitro

Se prepararon geles de colágeno/Matrigel al distribuir en cada pocillo de un Chamberslide (colágeno Biocoat Cellware, Tipo I, caras de cultivo de 8 pocillos: Becton dickinson 354630), 160  $\mu$ l de Matrigel diluido 1/6 (Matrigel reducido con factor de crecimiento: Becton dickinson 356230) en colágeno I (colágeno de cola de rata, tipo I: Becton dickinson 354236). La polimerización se produce a 37°C durante 1 h. A continuación, se añaden  $15 \times 10^3$  HUVEC por pocillo en 400  $\mu$ l de medio EBM (Clonetics C3121) + 2% de FCS + 10  $\mu$ g/ml de hEGF. Las células endoteliales se estimulan con 10 ng/ml de FGF2 (R&D, 133-FB-025), FGF4 (R&D, 235-F4-025) o FGF19 (R&D, 969-FG-025) durante 24 h a 37°C en una cámara de CO<sub>2</sub>. A continuación, la longitud total de los pseudotúbulos se cuantifica usando un sistema de bioecografía (Imagenia Biocom, Courtaboeuf, Francia).

## Análisis por transferencia Western de la fosforilación de AKT en HUVEC

Se siembran células HUVE (Promocell, C-12200) en un disco revestido con colágeno I de 35 mm (BD Biocoat, 354456) a  $0,5 \times 10^6$  células en 2 ml de medio EBM (Clonetics, CC-3121) que contiene 2% de FBS (Clonetics, CC-4101), 10  $\mu$ g/ml de hEGF (Clonetics, CC-4017) del estuche EGM singlequots (Clonetics, CC-4133), 1.250 ng/ml de heparina (Sigma, H3149) y 375 ng/ml de ECGS (BD Biosciences, 356006). A una confluencia de 90%, las células se someten a inanición durante la noche en 1,8 ml de RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014), 0,5% de FCS, 2 mM de glutamina, 1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen, 11140-050), piruvato sódico (Invitrogen, 11360-070). El día después, las células se estimulan 10 min mediante 200  $\mu$ l de medio de inanición equilibrado que contiene 10x FGF-4 (30 ng/ml; R&D, 235-F4-025) con o sin 10x SSR (3  $\mu$ M). Posteriormente, las células se enjuagan con PBS fría y la célula se somete a lisis con 75  $\mu$ l de RIPA que contiene 2,5 mM de ortovanadato y cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma, P8340). Los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min, y los sobrenadantes se recogieron. Las proteínas se separaron sobre 4-20% de geles de tris-glicina/poliacrilamida Novex (Invitrogen) y posteriormente se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, IB3010-01). Después de la incubación con 5% de leche desnatada en polvo en TBS-0,05% de Tween 80, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anti-fosfoAKT (Ser473, CST, 4058) diluido 1.000x en TBS, Tween, 1% de BSA. La señal de cada punto se obtiene después de la detección quimioluminiscente con SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, 34076) y la densidad del punto se cuantifica usando un BioImaging System Chemigenius2 (Syngene).

## ELISA de fosforilación de AKT sobre células

Se recogen células HUVEC confluentes y se siembran  $5 \times 10^4$  células en 50  $\mu$ l de RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014) con 0,5% de FCS (Hyclone, SH30070.03), 2 mM de glutamina, aminoácido no esencial en MEM 1x (Gibco, 11140-035), piruvato sódico en MEM 1x (Gibco, 11360-039) por pocillo en placas de 96 pocillos revestidas con colágeno I (Beckton Dickinson, 354650) durante la noche. Las células se estimulan 5 min con 100  $\mu$ l de medio staved equilibrado sin FCS que contiene 20 ng/ml de FGF4 y 600 nM de SSR. A continuación, añádanse 50  $\mu$ l de PFA al 8% en PBS (Polysciences, 18814) durante 15 min a temperatura ambiente y lávense las células 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS durante 2 min. Los sitios no específicos se bloquean durante 1 h a temperatura ambiente con PBS, Triton al

0,3%, suero normal de cabra al 0,1% (Zymed, 50-062Z) y el tampón de bloqueo se extrae y se reemplaza por anticuerpo antifosfo-Akt (Ser473) (CST, 4058) diluido 1/500 en PBS, Triton al 0,3% durante la noche. A continuación, el anticuerpo primario se elimina y se lava 3 veces con 200 µl de PBS durante 2 min. Se usa anticuerpo secundario contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (CST, 7074) para detectar la fosforilación de AKT después de una dilución 1/2.000 en PBS, 0,3% de Triton durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, las células se enjuagan con PBS y se añaden 100 µl de sustrato de HRP (Uptima, UP664781) durante 20 min en una habitación oscura. La reacción enzimática se finaliza con 100 µl de tampón de finalización (Uptima, UPS29590) y se mide la OD a 450 nm.

10 Unión a FGF-2 en células 300-19 transfectadas con FGFR

El FGF2 se marcó con Alexa Fluor 488 C5-maleimide (Invitrogen, A10254) siguiendo las recomendaciones del comprador.

15 Este AF488-FGF2 se usó en 10 ng/ml en experimentos de unión sobre células pre-B 300-19 murinas con las construcciones FGFR1 o FGFR4 en plásmidos pEF6-V5/His (Invitrogen). Se preincubó SSR (300 nM finales) 20 min con células en RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014) con 10% de FCS (Hyclone, SH30070.03), 2 mM de glutamina, aminoácido no esencial en MEM 1x (Gibco, 11140-035), piruvato sódico en MEM 1x (Gibco, 11360-039) y 150 mM de monoglicerol (Sigma, M6145) a 4°C bajo agitación a 150 rpm. A continuación, se añade FGF2 (10 ng/ml finales) durante 30 min y la unión se mide usando un citómetro de flujo FACS Calibur (Beckton Dickinson). También se analiza la fluorescencia mediana para cada condición.

Migración celular con diversos factores de crecimiento

25 La migración celular se determinó mediante un ensayo en cámara de Boyden modificado, al usar inserciones de 24 pocillos que contenían soportes permeables Transwell de un tamaño de poro de 8 µm con una membrana de policarbonato (Costar, Corning Inc.). Las células que crecían exponencialmente se sometieron a inanición en medio que contenía 0,2% de FBS durante 16 horas y se resuspendieron a  $5 \times 10^5$  células/ml en el mismo medio bajo en suero. Se sembraron 100 µl de la suspensión celular en la cámara superior, mientras que los quimioatrayentes y/o SSR se pusieron en la cámara inferior. Los quimioatrayentes probados incluyen: PDGF-BB, IGF-I, PIGF, EGF humanos, todos en 100 ng/ml, en presencia o ausencia de SSR (1 µM). Se usó medio que contenía 10% de FBS a control positivo. Después de 6 horas de incubación a 37°C, las células sobre la cara superior de la membrana se eliminaron usando una torunda de algodón, mientras que las células migradas sobre la superficie inferior se fijaron con 1% de paraformaldehído en PBS y los núcleos se tiñeron con DAPI para la cuantificación usando un microscopio fluorescente. La cuantificación se realiza al formar 5 imágenes aleatorias con una amplificación 10x y al contar el número de núcleos.

Proliferación y migración de PANC02

40 La proliferación celular se analizó sobre células que crecen exponencialmente que se sometían a inanición durante 16 horas en 100 µl de RPMI 1640 (Invitrogen, 32404-014) con 0,2% de FBS (Hyclone, SH30070.03), 2 mM de glutamina, aminoácido no esencial en MEM 1x (Gibco, 11140-035), piruvato sódico en MEM 1x (Gibco, 11360-039) y se sembraron a 4.000 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos. Después de la exposición a mitógenos y/o SSR durante 72 horas, la proliferación celular se determinó con el uso del CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU. de A.) según las instrucciones del fabricante. La migración celular se determinó mediante un ensayo en cámara de Boyden modificado, al usar inserciones de 24 pocillos que contenían soportes permeables Transwell de un tamaño de poro de 8 µm con una membrana de policarbonato (Costar, Corning Inc.). Las células que crecían exponencialmente se sometieron a inanición en medio que contenía 0,2% de FBS durante 16 horas y se resuspendieron a  $5 \times 10^5$  células/ml en el mismo medio bajo en suero. Se sembraron 100 µl de la suspensión celular en la cámara superior, mientras que los quimioatrayentes y/o SSR se pusieron en la cámara inferior. Se usó medio que contenía 10% de FBS a control positivo. Después de 6 horas de incubación a 37°C, las células sobre la cara superior de la membrana se eliminaron usando una torunda de algodón, mientras que las células migradas sobre la superficie inferior se fijaron con 4% de para formaldehído y los núcleos se tiñeron con DAPI para la cuantificación.

55

Proliferación de células de mieloma B9

60 La proliferación celular se analizó sobre células que crecen exponencialmente que se sometían a inanición durante 16 horas en IMDM (Invitrogen, 31980048), 0,2% de FBS, medio que contiene glutamina 2 mM y sembradas a 4.000 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos. Después de la exposición a mitógenos y/o SSR durante 72 horas, la proliferación se determinó con el uso del CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU. de A.) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo Alphascreen surefire

Día 0: siémbrense en placa células HEK293:mVEGFR2wt o HEK293:PDGFR $\beta$  a 10.000 células/pocillo (placa de 96 pocillos Costar que se une a células) y déjese que se unan durante la noche

Día 1: sométanse a inanición las células en DMEM (0% de suero) durante un mínimo de 3 h; prepárese una mezcla de 50 ng/ml de VEGF164 o PDGF-BB en DMEM (0% de suero) y estimúlese durante 5 o 15 minutos; sométanse las células a lisis en tampón de lisis procedente del ensayo SureFire (Perkin Elmer): sométanse las células a lisis en 50  $\mu$ l de tampón, agítase la placa durante 10 min a TA y a continuación congélese a -20°C hasta un uso adicional; fórmese una mezcla de tampón de lisis con proteína y analícese con pERK1/2, ERK1/2 total y un pPLCy de diseño personalizado y PLCy total según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1: Identificación de SSR128129E como un inhibidor alostérico multi-FGFR

El objetivo de este estudio era desarrollar compuestos químicos de bajo peso molecular que se unan al dominio extracelular (ECD) de FGFR e inhiban la señalización de FGFR. Dado que es un reto prever cómo podría actuar un compuesto pequeño con un polipéptido mucho mayor (es decir FGF) a través de simple impedimento estérico para el sitio ortostérico, se utilizaron formatos de ensayo de unión a múltiples ligandos para determinar si cualesquiera compuestos identificados estaban actuando ortostéricamente o a través de un mecanismo alostérico. Inicialmente, se desarrolló un ensayo de unión por proximidad con centelleo (SPA) de alto rendimiento para identificar compuestos que inhiban la unión de  $^{125}$ I-FGF2 a FGFR1-ECD, que consiste en los tres dominios similares a Ig D1-3, acoplado a un fragmento Fc (FGFR1 $^{\Delta 123}$ /Fc). Después del cribado de >20.000 compuestos la optimización química, un compuesto, SSR128129E (abreviado como "SSR" de ahora en adelante), inhibía la unión de  $^{125}$ I-FGF2. En ensayos de SPA adicionales, SSR actuaba como un inhibidor multi-FGFR, bloqueando la unión de diferentes ligandos de FGF a diversos FGFR mientras que no inhibía la unión de >100 ligandos distintos con homología estructural relacionada o composición química totalmente diferente a su receptor cognado; este hallazgo sugería bien un mecanismo competitivo (ortostérico) o bien además una interacción alostérica caracterizada por una alta capacidad de cooperación negativa (Christopoulos y Kenakin, 2002).

Una característica distintiva de las interacciones alostéricas es el fenómeno de 'dependencia de la sonda', es decir, variaciones en la magnitud y la dirección de una interacción alostérica dependiendo de la naturaleza del complejo ligando-receptor ortostérico con el que está interactuando el modulador (May y cols., 2007). Para determinar si los efectos de SSR sobre la unión de  $^{125}$ I-FGF2 en el SPA dependían de la configuración de la proteína de fusión FGFR/Fc manipulada sembrada sobre un sustrato artificial, se estudió a continuación si SSR inhibía la unión de un FGF1 lumio Marcado (FGF1-lumio) fluorescente a un ECD purificado de FGFR2 sin el marcador Fc (FGFR2 $^{\Delta 123}$ ), al medir la velocidad de volteo como un parámetro de anisotropía. Cuando se añadía FGFR2 $^{\Delta 123}$  a FGF1-lumio, la velocidad de volteo del complejo ligando/receptor era menor que la de FGF-lumio solo debido a su mayor tamaño. Si SSR inhibía la unión del ligando, la velocidad de volteo se debe incrementar de nuevo. Sin embargo, incluso a con un exceso molar de >1.000 veces, SSR no alteraba la velocidad de volteo del complejo, indicando una falta de competición directa entre SSR y FGF1-lumio (figura 5A). Finalmente, los ensayos de unión con  $^{125}$ I-FGF2 sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales aórticas porcinas que sobreexpresan FGFR1 (PAE-FGFR1) también revelaban que SSR (incluso con concentraciones  $\mu$ M altas) era incapaz de inhibir la unión de  $^{125}$ I-FGF2 a su receptor cuando el último se expresa en su conformación más natural en células intactas; sin embargo, un anticuerpo para  $\alpha$ FGF2 neutralizador era eficaz. En este último paradigma experimental, y en contraste con el SPA, SSR tampoco antagonizaba la unión de los ligandos FGF adicionales a otros FGFR (es decir FGF2 o FGF4 a FGFR2; FGF2 a FGFR4).

Colectivamente, estos resultados indicaban que la actividad inhibidora de SSR sobre la unión de ligandos FGF era muy dependiente de la conformación del FGFR, e incoherente con un simple mecanismo competitivo que confiaba en el impedimento estérico para un dominio de unión solapado. La capacidad de moduladores alostéricos de compuesto pequeño para afectar diferencialmente a la unión de ligandos ortostéricos dependiendo de las condiciones de ensayo, según se apunta en la presente para el FGFR, se ha presentado previamente en el campo de los GPCR (Litschig y cols., 1999; Price y cols., 2005). Presumiblemente, el FGFR1 $^{\Delta 123}$ /Fc existe en una conformación que permite la transmisión de un efecto alostérico negativo sobre la afinidad de  $^{125}$ I-FGF2 por la unión de SSR, mientras que la ausencia del marcado Fc, o la expresión de todo el receptor intacto en su ambiente natural, no lo hace.

Ejemplo 2: SSR es un inhibidor alostérico y multi-FGFR

Debido a que el análisis de la expresión de FGFR sobre células HUVEC (C-12200, Promocell) mediante PCR cuantitativa (Figura 1A) y RT-PCR usando cebadores específicos para detectar la expresión del gen de FGFR (Figura 1B) y variantes de FGFR1 (Figura 1C) demostraba solo la expresión de FGF-R4 y FGF-R1 $\beta$ 3c, en primer lugar se usaron células HUVE para estudiar la actividad antagonista de SSR sobre diferentes FGFR. Se sabe que FGF19 estimula específicamente FGFR4, mientras que FGF4 (pero no FGF19) activa solamente FGF-R1 en células BaF/3 transfectadas con la proteína de fusión FGFR1-hMpl (Figura 2A) mientras que FGF19 no puede hacerlo (Figura 2B). Así, FGFR1 y FGFR4 en HUVEC pueden ser estimulados con FGF4 y FGF19, respectivamente.

La proliferación de HUVEC se estimula con FGF2 y FGF4 pero no con FGF19 (Figura 4A, sugiriendo que la proliferación de HUVEC está bajo el control de FGFR1. SSR es capaz de inhibir la proliferación de HUVEC inducida por FGF2, indicando que SSR inhibe el receptor FGFR1 $\beta$ 3c (Figura 4B). Ensayos de unión con  $^{125}$ I-FGF2 sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales aórticas porcinas que sobreexpresan FGFR1 (PAE-FGFR1) revelaban adicionalmente que SSR (incluso a concentraciones  $\mu$ M altas) era incapaz de inhibir la unión de  $^{125}$ I-FGF2 a su receptor. Sin embargo, un anticuerpo para  $\alpha$ FGF2 neutralizador era eficaz (Figura 4D). También se ensayó si SSR inhibía la autofosforilación de FGFR, una etapa crítica en la señalización de FGFR. La inmunoprecipitación de FGFR1 expresado en células epiteliales de almohadilla grasa de rata, seguida por inmunotransferencia de FGFR1 fosforilado, revelaba que la fosforilación de la tirosina FGFR1 inducida por FGF2 era muy reducida por SSR en el intervalo de concentración nanomolar (Figura 4C). Notablemente, incluso en dosis altas, SSR no elimina completamente la fosforilación de la tirosina FGFR1, dejando un bajo nivel residual (Figura 4C). El efecto de SSR sobre la unión de FGF1 lumioconjugado en el dominio extracelular de FGFR2 se ha analizado y SSR no inhibe la interacción FGF1/FGFR2 (Figura 5A). Del mismo modo, SSR no es capaz de inhibir la dimerización de FGFR2 o FGF2 (Figura 5B y 5C).

La migración de HUVEC también se estimuló mediante FGF2- y FGF4 pero no mediante FGF19 (Figura 6A). SSR, en este contexto, también es capaz de inhibir la actividad de FGFR1 conduciendo a una reducción de la migración quimiotáctica de HUVEC inducida por FGF2 (Figura 6B).

A la inversa, la angiogénesis in vitro es estimulada por FGF2 y FGF19 mientras que FGF4 es inactivo, sugiriendo que FGFR4 controla la angiogénesis in vitro en este ensayo (Figura 7A). A un intervalo nanomolar bajo, SSR bloquea la angiogénesis de HUVEC inducida por FGF2, demostrando que SSR es capaz de inhibir el proceso celular controlado por FGFR4 (Figura 7B).

A fin de evaluar la actividad de SSR sobre FGFR2 y sobre la variante FGFR2-IIIb, se han usado la proliferación y la migración de células PANC02 debido a que estas respuestas celulares se pueden estimular mediante 100 ng/ml de FGF7 (Figura 8A y 8B), un ligando específica para FGFR2-IIIb. La inducción de FGF7, con o sin VEGF, es bloqueada por la adición de 100 nM de SSR, mostrando que SSR es capaz de inhibir el receptor FGFR2 y la variante 3b (Figura 8A y 8B).

Para estudiar el efecto de SSR sobre FGFR3, se ensayó la proliferación de células de mieloma B9, que expresan bien FGFR3<sub>WT</sub> o bien FGFR3<sub>TD</sub> (una variante de FGFR3 activada constitutivamente inducida por la mutación K650E, incluso en ausencia de cualquier ligando; Truedel y cols; blood 2006), mediante la estimulación con FGF1 (25 ng/ml). Mientras que la línea celular B9-FGFR3<sub>WT</sub> podía ser inducida por FGF1 e inhibida por 0,1  $\mu$ M de SSR (Figura 9), la línea celular B9-FGFR3<sub>TD</sub> era insensible a SSR (Figura 9), indicando que SSR puede inhibir el receptor FGFR3 y confirmando que SSR no actúa sobre el dominio de cinasa de FGFR.

Conjuntamente, estos resultados indican que SSR es capaz de inhibir todas las isoformas de FGFR (FGFR1, R2, R3 y R4) y variantes de FGFR.

Ejemplo 3: SSR no es capaz de inhibir respuestas celulares inducidas por otros factores de crecimiento

Puesto que SSR inhibía diferencialmente la eficacia de señalización mediada por FGF, se investigó posteriormente si también afecta a respuestas celulares dependientes de FGF in vitro. Usando HUVEC, SSR inhibía los efectos quimiotácticos de FGF2.

SSR no afectaba a respuestas celulares inducidas por PIGF, EGF, PDGF-BB e IGF, que se sabe que activan todos miembros de la familia de receptores de tirosina cinasa (Figura 10).

Ejemplo 4: SSR128129E se une a un sitio alostérico en el dominio D3 similar a Ig de la región extracelular de FGFR:

Puesto que SSR era un inhibidor multi-FGFR, se usaron fragmentos polipeptídicos de los diversos subtipos de FGFR (humano). Los espectros de NMR con diferencia de transferencia de saturación (STD-NMR) de SSR revelaban que SSR se une al ECD de FGFR1 (FGFR1 <sup>$\delta$ 123</sup>) (Figura 11A). Esto se confirmó mediante el análisis del perfil de (1 D)-NMR unidimensional, que revelaba un ensanchamiento del pico de la señal de FGFR1 <sup>$\delta$ 123</sup> al añadir SSR (Figura 11A). Esta unión es específica debido a que no se observa unión con proteína extracelular de TNF-R1 (Figura 11A). A continuación, se usaron fragmentos de ECD de FGFR para cartografiar el sitio de unión de SSR a uno de los tres dominios de Ig. Las medidas de 1 D-NMR de un fragmento que contiene solamente el dominio D3 (FGFR1 <sup>$\delta$ 23</sup>) identificaron un sitio de unión para SSR en este dominio yuxtamembranario (Figura 11B). De hecho, FGFR1 <sup>$\delta$ 23</sup> y FGFR1 <sup>$\delta$ 123</sup> dan señales idénticas (línea ancha) lo que significa que se obtuvo la misma afinidad para estas proteínas mientras que FGFR1 <sup>$\delta$ 12</sup> y FGFR1 <sup>$\delta$ 2</sup> provocan líneas finas (Figura 11B). La calorimetría de valoración isotérmica (ITC), que usa dos fragmentos de ECD, FGFR2 <sup>$\delta$ 23</sup> (que consiste en el dominio D2 y 3) y FGFR3 <sup>$\delta$ 23</sup>, revelaba que SSR se unía a FGFR2 y FGFR3 (Figuras 11C y 11D).

La unión de SSR al dominio D3 de FGFR era específica, ya que el compuesto no se unía a ligandos FGF (FGF1 y FGF2; Figura 12A, 12B y 12C) cuando se analizaba mediante ITC o STD-NMR. Por otra parte, la heparina no interfería con la unión de SSR a FGFR, ya que STD-NMR revelaba una señal comparable de SSR al FGFR bien en presencia o bien en ausencia del análogo de heparina octasulfato de sacarosa (SOS, Figura 12D).

Ejemplo 5: La unión alostérica de SSR induce el cambio de conformación en FGFR

A continuación, se exploró si se podía obtener una evidencia directa de un cambio de conformación del FGFR mediado por la unión de SSR a la región identificada en los experimentos precedentes. Por lo tanto, se realizaron medidas espectroscópicas infrarrojas con transformada de Fourier (FTIR) de fragmentos de ECD de FGFR2, que consisten en los dominios dominios D2-3 (FGFR2<sup>Δ23</sup>). La adición de SSR a cualquier variante daba como resultado un incremento en la amplitud de la banda de amida I del espectro de FTIR con un máximo alrededor de 1,640 cm<sup>-1</sup>, de acuerdo con un cambio de conformación global (Figura 12A).

Se exploró posteriormente si SSR se unía a residuos de aminoácido que forman parte del sitio ortostérico en D3 o a un sitio alostérico alternativo. Inicialmente, se usaron los algoritmos de acoplamiento molecular de los paquetes de software MOLEGRO, Autodock y YASARA y datos cristalográficos disponibles. Las pruebas de acoplamiento de SSR sobre FGFR2<sup>Δ23</sup> usando ambos métodos identificaron dos sitios de unión putativos, uno centrado alrededor de His<sup>293</sup> y el otro alrededor de Tyr<sup>328</sup>; estos sitios de unión putativos están, con relación al sitio de unión al ligando FGF, situados en la cara opuesta del receptor y forman un bolsillo hidrófobo ~ 25 Å a partir del sitio de unión ortostérico. Notablemente, ambos residuos no se solapan con residuos del bolsillo de unión a FGF ortostérico. Para evaluar la importancia funcional de ambos sitios de unión de SSR putativos, se usó el software FoldX de campo de fuerza molecular (Schymkowitz y cols., 2005) para diseñar mutaciones que reducirían o eliminarían la unión al ligando alostérico, sin, sin embargo, perturbar la estabilidad de conformación global de la estructura: (i) FGFR2<sup>Δ23-Y328D</sup>, que retira una interacción hidrófoba con SSR al reemplazar el residuo aromático por un aspartato cargado negativamente; (ii) FGFR2<sup>Δ23-H293L</sup>, que retira un residuo crítico del otro sitio de unión putativo para SSR; y (iii) el mutante doble FGFR2<sup>Δ23-Y328D/H293L</sup> (denominado FGFR2<sup>Δ23-YH</sup>). Los experimentos de unión por ITC mostraban que SSR no se unía a FGFR2<sup>Δ23-Y328D</sup> (Figura 13B y 13C). Estos hallazgos son coherentes con un modelo por el que SSR se une a un sitio alostérico formado por un bolsillo hidrófobo cerca del sitio de unión a ligando ortostérico, y en el que el residuo Tyr<sup>328</sup> parece ser crítico para mediar en la interacción entre SSR y FGFR2. También se analizó el espectro de FTIR de los susodichos fragmentos de FGFR2 mutados. Ninguna de estas mutaciones sencillas o dobles inducían una variación importante en el espectro de FTIR, indicando que la configuración tridimensional global de estas variantes de FGFR era comparable. SSR inducía una variación comparable del espectro de FTIR de FGFR2<sup>Δ23-H293L</sup> y el fragmento de FGFR2<sup>Δ23</sup> natural (Figura 14A y 14B) sugiriendo que la mutación His293 en Leu293 no es suficientemente drástica o que His293 no está muy implicado en la interacción con SSR. En contraste, SSR no inducía este cambio en el espectro de FTIR de los fragmentos de FGFR2<sup>Δ23-Y328D</sup> o FGFR2<sup>Δ23-YH</sup> mutados (Figura 14C y 14D), indicando que el residuo Tyr<sup>328</sup> era en efecto crítico para mediar en el cambio de conformación alostérico de FGFR2 al unirse a SSR.

Ejemplo 6: La mutación del sitio de unión a SSR alostérico reduce la inhibición de SSR de la señalización de FGFR

Para determinar la importancia funcional del sitio alostérico en la regulación de la señalización de FGFR, se generaron líneas celulares HEK293 estables que expresan bien un FGFR2<sup>WT</sup> funcional o bien la variante FGFR2<sup>Δ23-Y328D</sup>, y se analizó si SSR inhibía la activación de ERK1/2 por FGF2 en estas líneas celulares. La inmunotransferencia revelaba que la inhibición de FGF2 inducía la fosforilación de ERK1/2 en células FGFR2<sup>Δ23-Y328D</sup> por SSR se reducía (valor de IC<sub>50</sub>: 121 ± 30 nM) con relación a su potencia inhibitoria en las células FGFR2<sup>WT</sup> (valores de IC<sub>50</sub>: 28 ± 12 nM) (Figura 15A y 15B), indicando que este sitio alostérico no solo es importante para la unión de SSR a fragmentos de FGFR2 purificados in vitro, sino también por su actividad inhibitoria sobre la señalización de FGFR2 en condiciones fisiológicas en células. El hecho de que la mutación Y<sup>328</sup>D no suprime completamente la actividad inhibitoria de SSR puede sugerir que otros residuos adyacentes además de Tyr<sup>328</sup> también contribuyen a la unión de SSR cuando FGFR2 se expresa en un contexto fisiológico.

Ejemplo 7: SSR es un inhibidor "sesgado" de la fosfoseñalización dependiente de FGFR

A fin de evaluar el efecto de SSR sobre la fosfoseñalización controlada por FGFR, células HEK293 se han transfectado con FGFR2 y las dos rutas principales después de la autofosforilación de FGFR, PLCγ y FRS2, se han estudiado mediante transferencia Western en comparación con un inhibidor de tirosina cinasa FGFR SU5402 publicado que se describe que inhibe cascadas de FRS2 y PLCγ dependientes de FGFR (Zhen y cols., Oncogene 2007). En estas células, FGF induce la fosforilación de FRS2, Erk1/2 y PLCγ. SU5402 bloquea todas estas inducciones mientras que SSR sólo inhibe la ruta FRS2 (Figura 16A y 16B), ilustrando el antagonismo sesgado obtenido con SSR. Más generalmente, estas diferencias en la fosforilación se pueden usar como un indicador para evaluar moduladores alostéricos.

## Ejemplo 8: Metodología para buscar un dominio frustrado en el dominio extracelular de receptores de tirosina cinasa

Uno de los posibles mecanismos moleculares del cambio de conformación descrito a partir del ejemplo 5 implica la presencia de un dominio frustrado (véase anteriormente para la definición). Cuando se analizan los dominios D2 y D3 de FGFR2 humano usando AGADIR (un algoritmo de predicción de estabilidad de la hélice; Muñoz, V. & Serrano, L. 1994), se identificó una secuencia de residuos, que variaba de Tyr<sup>319</sup> a Arg<sup>330</sup>, (incluyendo así el residuo crítico Tyr<sup>328</sup>) como la única región que es propensa a sufrir una variación desde una lámina β hasta una hélice α. De acuerdo con este modelo teórico, la sustitución de Tyr<sup>328</sup> por aspartato (FGFR2<sup>Q23-Y328D</sup>), que se predijo por AGADIR que reducía la helicidad alfa y así reducía la frustración del dominio, evitaba en efecto el cambio de conformación observado, según se detecta por análisis de FTIR. Un análisis de secuencia similar de receptores de factores de crecimiento adicionales incluyendo VEGFR1, -2 y -3 y PDGFRβ, entre otros TKR, contenía regiones de puntuación AGADIR relativamente altas, lo que se podría invertir al mutar un residuo crítico de esta región en aspartato. Se tienen algunos datos preliminares de VEGFR2 en los que mutar K609D y K648D daba como resultado una reducción de la señalización de ERK1/2 al estimular con VEGF.

## Ejemplo 9: Cribado de afinidad de moduladores alostéricos de FGF-R mediante SEC-LC/MS y evaluación de la actividad de compuestos identificados

La metodología SEC-LC/MS es una técnica analítica usada para el cribado de afinidad dependiente de un sistema bidimensional acoplado en línea: una cromatografía de exclusión por tamaño asociada con una cromatografía de líquidos de alta resolución seguida por ionización por electropulverización – espectrometría de masas de tiempo de vuelo para la detección.

Se basa en la capacidad de algunos compuestos para interactuar con polipéptidos solubles (péptido, dominio proteínico o proteína de longitud completa). Después de mezclar un conjunto de compuestos pequeños con el péptido de interés, el complejo péptido-ligando induce una variación de masa que permite la separación entre compuestos pequeños no unidos y unidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño. A continuación, los complejos se disocian y los aglutinantes se detectan usando una LC/ESI-TOF de alta resolución para la medida exacta de la masa (por ejemplo con un Waters LCT Premier Mass Spectrometer). Un algoritmo de deconvolución permite la identificación de moléculas unidas a partir del análisis de detección de masas.

Para la identificación de moduladores alostéricos de FGF-R, esta tecnología se puede aplicar al dominio extracelular de diferentes FGF-R, bien naturales o bien mutados. La forma natural permite la detección de todos los aglutinantes del dominio extracelular. Otro modo de conseguir el cribado de moduladores alostéricos se podría hacer al usar una forma "abierta" de la hélice de FGF-R2 cercana al sitio de unión a SSR128129 obtenida con mutaciones Tyr328Arg-Ile329Lys que estabilizan hélice alfa permitiendo la sensibilización a la unión a SSR128129. En este caso, este FGF-R2 mutado puede reemplazar a WT FGF-R2. Se puede usar una estrategia similar para llevar a cabo un cribado sobre el FGF-R1, -R3 o -R4 con mutaciones en los aminoácidos correspondientes a Tyr328 e Ile329 en FGF-R2. La forma mutada en Tyr328 (FGF-R2) o aminoácidos mutados correspondientes en otros FGF-R se pueden usar para realizar un contracribado. Debido a que SSR128129 no se une en el FGF-R2, mutado en Tyr328Asp cerca de un bolsillo hidrófobo, esta forma mutada se puede usar para descartar parte de los compuestos que no interactúan con el bolsillo elegido como diana en FGF-R2.

En todos los casos, esta estrategia conduce a la identificación de moléculas capaces de unirse en el bolsillo diana del péptido de interés. En una etapa siguiente, se tiene que evaluar el efecto celular. En primer lugar, los seleccionados tienen que inhibir una ruta inducida por FGF, tal como la fosforilación de AKT en células HUVEC, según se observa con SSR en experimentos de transferencia Western (Figura 17A y 17B). El estado de fosforilación de AKT en células HUVEC se puede medir mediante metodología de ELISA sobre células. Este formato de ensayo se ha desarrollado internamente para la detección directa de la fosforilación de AKT en diversas células tales como HUVEC y permite la detección del efecto de SSR sobre HUVEC estimuladas con FGF4 (Figura 17C). Una característica típica de los moduladores alostéricos de FGFR es su incapacidad para competir con la unión a FGF. A fin de evaluar esto, se ha elaborado un ensayo de unión sobre células pre-B 300-19 murinas transfectadas con FGFR. FGF2 marcado con AlexaFluor488 en 10 ng/ml se une a FGFR1 o FGFR4 expresado en células 300-19 que no expresan naturalmente ningún FGFR, y SSR a 300 nM no es capaz de competir con esta unión sobre FGFR1 o FGFR4 mediante análisis de citometría de flujo (Figura 17D).

## Ejemplo 10: Identificación de zonas frustradas putativas en el receptor VEGF-R2 y análisis de mutaciones de las zonas frustradas putativas

La estrategia desarrollada para FGF-R se aplica a otra TK receptora: VEGF-R2 o KDR. Como un enfoque inicial para identificar regiones que podrían alojar sitios diana alostéricos putativos, se utilizó el programa de software AGADIR<sup>1</sup> para identificar regiones que sean propensas a sufrir cambios estructurales (p. ej. transiciones de lámina β a hélice α), empleando secuencias de aminoácidos primarias disponibles procedentes del receptor VEGF-R2 murino (número de registro NP\_034742.2). Esto daba como resultado varias regiones con una propensión helicoidal

superior, aunque en la estructura del dominio de Ig principalmente se deben esperar estructuras de lámina  $\beta$ . Los resultados de los análisis de Agadir se muestran en la figura 18A

5 Posteriormente, después de mutar informáticamente cada aminoácido procedente de VEGF-R2 secuencialmente por un residuo de aspartato (D), se analizó la puntuación AGADIR de nuevo y se seleccionaron las mutaciones (i) a partir de las cuales era mayor (más negativo) el cambio en la propensión helicoidal y (ii) que estaban situadas en los dominios de Ig situados más cerca del dominio transmembranario. A partir de estas, K609D y K648D, residiendo ambos residuos en el dominio IgD6 de mVEGF-R2 (Figura 18B), daban la mayor reducción en la propensión helicoidal y se usaron adicionalmente para el análisis en células (véase además el ejemplo 12).

10 Ejemplo 11: Identificación de zonas frustradas putativas en el receptor PDGF-R $\beta$  y análisis de mutaciones de las zonas frustradas putativas

15 Como un enfoque inicial para identificar regiones que podrían alojar sitios diana alostéricos putativos, se utilizó el programa de software AGADIR<sup>1</sup> para identificar regiones que sean propensas a sufrir cambios estructurales (p. ej. transiciones de lámina  $\beta$  a hélice  $\alpha$ ), empleando secuencias de aminoácidos primarias disponibles procedentes del receptor PDGFR $\beta$  humano (número de registro NP\_002600.1). Esto daba como resultado varias regiones con una propensión helicoidal superior, aunque en la estructura del dominio de Ig principalmente se deben esperar estructuras de lámina  $\beta$  (Figura 19). Posteriormente, después de mutar informáticamente cada aminoácido procedente de PDGFR $\beta$  secuencialmente por un residuo de aspartato (D), se analizó la puntuación AGADIR de nuevo y se seleccionaron las mutaciones (i) a partir de las cuales era mayor (más negativo) el cambio en la propensión helicoidal y (ii) que estaban situadas en los dominios de Ig situados más cerca del dominio transmembranario. A partir de estas, L383D y K387D, residiendo ambos residuos en el dominio IgD3 de hPDGFR $\beta$ , daban la mayor reducción en la propensión helicoidal (Figura 19).

20

Ejemplo 12: Método de cribado para identificar compuestos que inducen una señalización "sesgada"

25 La unión de VEGF o PDGF-BB induce la dimerización de los respectivos receptores cognados, lo que, a su vez, induce la fosforilación de los dominios de cinasa intracelulares. Posteriormente, se activan dos rutas principales (de interés según el antagonista sesgado para FGF-R SSR) incluyendo la ruta ERK1/2 (Figuras 21A y 21C) y la ruta PLC $\gamma$  (representada esquemáticamente en la Figura 20). Medir la activación de cada una de las rutas, en presencia o ausencia de un posible inhibidor, conduce a la identificación de compuestos que inducen una señalización "sesgada", mediante la inhibición de solo una de las rutas de señalización.

30 Para VEGF-R2, los dos receptores VEGFR2 mutantes (VEGFR2<sup>K609D</sup> y VEGFR2<sup>K648D</sup>) identificados en el ejemplo 10 y la forma silvestre de VEGF-R2 se expresaron establemente en células HEK293. El receptor VEGFR2<sup>WT</sup> responde claramente al activar la fosforilación de ERK1/2. Aunque el mutante VEGFR2<sup>K609D</sup> tiene una capacidad de señalización reducida a través de ERK1/2 (pero suficiente para el ensayo de contracribado), el mutante VEGFR2<sup>K648D</sup> la pierde. Los resultados se resumen en la figura 21A.

35

40 Para PDGF-R $\beta$ , las células HEK293 que sobreexpresan células hPDGFR $\beta$  se estimulan bien con medio que no contiene aditivos ("0"), que contiene 10% de suero bovino fetal (10% de FBS), 50 ng/ml de PDGF-BB (50 ng/ml) o 1 ng/ml de PDGF-BB (1 ng/ml) según el procedimiento Alphascreen surefire (Figura 21 B). En la Figura 21C, el panel de la izquierda indica de nuevo la representación esquemática de las mezclas para detectar las proteínas de ERK1/2 activadas o totales después de la estimulación. Los paneles de la derecha indican las medidas detectadas después de la estimulación con PDGF-BB de las células según se mide a través del método de detección Alphascreen surefire. Esto muestra que se puede detectar una señal clara cuando las células se estimulan bien con 10% de FBS o bien 50 ng/ml de PDGF-BB, mientras que está presente una señal mucho menor sin o con 1 ng/ml de estimulación con PDGF-BB. La respuesta de PLC $\gamma$  se mide de un modo similar.

45

50 Un método de cribado para identificar compuestos que inducen una señalización "sesgada" sobre VEGF-R2 o PDGF-R $\beta$ , como SSR sobre FGF-R, se puede basar en la respuesta de Erk1/2 y PLC $\gamma$ . Comparar la respuesta de ERK1/2 y la de PLC $\gamma$  en presencia y ausencia de posibles inhibidores alostéricos permite la identificación de compuestos que actúan como un inhibidor sesgado: inhibitor solamente una de las dos rutas de señalización. Las construcciones mutadas de VEGF-R2 o PDGF-R $\beta$  pueden servir para un ensayo de contracribado para verificar el mecanismo de acción de moduladores alostéricos identificados. Sobre los receptores mutados, los compuestos tienen que perder su capacidad de modulación del receptor.

**REFERENCIAS**

- Barth, A. Selective monitoring of 3 out of 50 000 protein vibrations. *Biopolymers* 67, 237-241 (2002).
- Beenken, A. & Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews* 8, 235-253 (2009).
- 5 Bossard, C., y cols. Antiangiogenic properties of fibstatin, an extracellular FGF-2-binding polypeptide. *Cancer Res* 64, 7507-7512 (2004).
- Callarts-Vegh y cols., *J Neurosci.* 26, 6573-6582 (2006)
- Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936 (2005).
- 10 Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005).
- Cenni, E., y cols. Inhibition of angiogenic activity of renal carcinoma by an antisense oligonucleotide targeting fibroblast growth factor-2. *Anticancer Res* 25, 1109-1113 (2005).
- Christopoulos, A., Sitio de unión alostéricos on cell surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 198-210 (2002).
- 15 Christopoulos, A. and Kenakin, T. G protein coupled receptor, allostereism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54, 323-374 (2002).
- Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M.A., Cotten, M. & Christofori, G. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* 60, 7163-7169 (2000).
- 20 Crump, J.G., Maves, L., Lawson, N.D., Weinstein, B.M. & Kimmel, C.B. An essential role for Fgfs in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning. *Development* 131, 5703-5716 (2004).
- Dimitroff, C.J., y cols. Anti-angiogenic activity of selected receptor tyrosine kinase inhibitors, PD166285 and PD173074: implications for combination treatment with photodynamic therapy. *Invest New Drugs* 17, 121-135 (1999).
- 25 Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149 (2005).
- Furihata, K., Shimotakahara, S. And Tashiro, M. An efficient use of the WATERGATE W5 sequence for observing a ligand binding with a protein receptor. *Magn. Reson. Chem.* 46, 799-802 (2008).
- Ghabrial, A.S. & Krasnow, M.A. Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis. *Nature* 441, 746-749 (2006).
- 30 Grassot, J., Gouy, M., Perriere, G. & Mouchiroud, G. Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. *Molecular biology and evolution* 23, 1232-1241 (2006).
- Innis, C.A. & Hyvonen, M. Crystal structures of the heparan sulfate-binding domain of follistatin. Insights into ligand binding. *J Biol Chem* 278, 39969-39977 (2003).
- 35 Kenakin, T. y cols. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol rev*, 62, 265-304 (2010).
- Kubo, H., y cols. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8868-8873 (2002).
- Lavine, K.J., y cols. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes & development* 20, 1651-1666 (2006).

- Leach, K., Sexton, P.M. and Christopoulos, A. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 382-389 (2007).
- Litschig, S. y cols., CPCCOEt, a non competitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist inhibits receptor signalling without affecting glutamate binding. *Mol. Pharmacol.* 55, 453-461 (1999).
- 5 Malemud, C.J. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 375, 10-19 (2007).
- May, L.T., Leach, K., Sexton, P.M. and Christopoulos, A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 1-51 (2007).
- 10 McDermott, L.A., y cols. RO4383596, an orally active KDR, FGFR, and PDGFR inhibitor: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem* 13, 4835-4841 (2005).
- Muñoz, V. & Serrano, L. (1994) Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nature Struct. Biol.* 1, 399-409 (1994)
- Nagendra, H.G., y cols. Sequence analyses and comparative modeling of fly and worm fibroblast growth factor receptors indicate that the determinants for FGF and heparin binding are retained in evolution. *FEBS letters* 501, 51-58 (2001).
- 15 Ornitz, D.M. & Marie, P.J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development* 16, 1446-1465 (2002).
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993-995 (2006).
- 20 Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B. & Blundell, T.L. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029-1034 (2000).
- Presta, M., y cols. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178 (2005).
- 25 Price, M.R. y cols. Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 68, 1484-1495 (2005).
- Rost, B. Rising accuracy of protein secondary structure prediction. In « Protein structure determination, analysis and modeling for drug discovery, pp207-249. (ed. D. Chasman, Nueva York, Dekker, 2003)
- Schymkowitz, J., y cols. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic acids research* 33, W382-388 (2005).
- 30 Shin, J.W., y cols. Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell* 17, 576-584 (2006).
- Urban J.D. ,y cols. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 1-13 (2007).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SANOFI-AVENTIS

<120> DOMINO DE UNIÓN A INHIBIDOR ALOSTÉRICO EXTRACELULAR PROCEDENTE DE UN RECEPTOR DE TIROSINA CINASA

5 <130> FR2009-067T

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 39

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 1

His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Tyr  
1 5 10 15

Leu Lys Val Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile  
20 25 30

Glu Val Leu Tyr Ile Arg Asn  
35

<210> 2

15 < 211> 20

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Lys Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu  
1 5 10 15

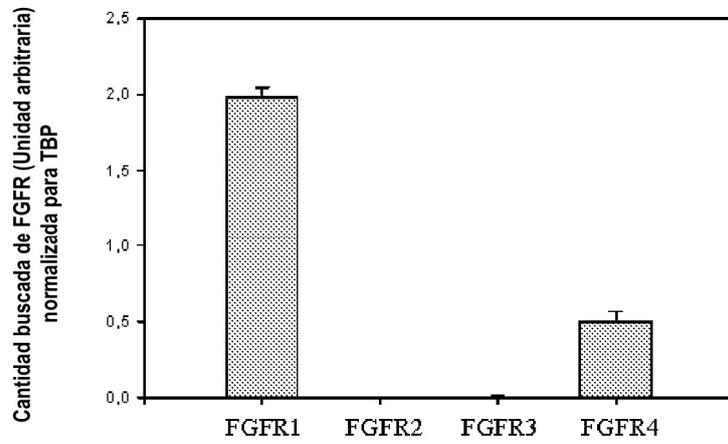
Tyr Ile Arg Asn  
20

20

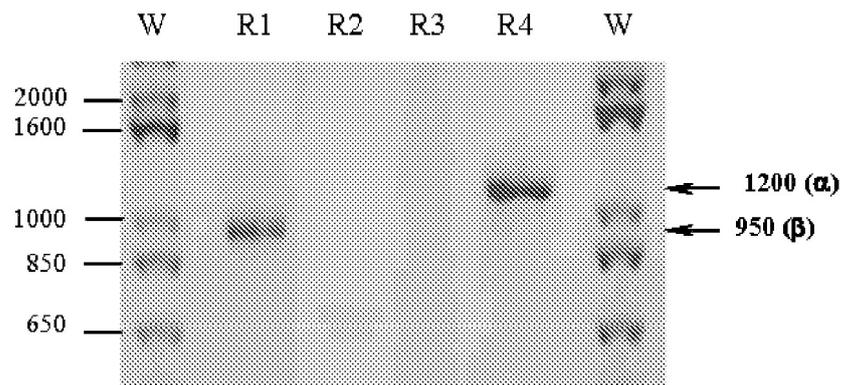
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de un sitio de unión a inhibidor alostérico que consiste bien en SEQ ID N° 1 o bien una secuencia que presenta al menos 70%, 80%, 90% o 95% de homología con SEQ ID N° 1, para cribar inhibidores de compuesto pequeño no poliméricos de FGFR, teniendo dichos inhibidores un peso molecular de menos de 1.000 D.
- 10 2. Un método para la identificación de un sitio de unión a inhibidor alostérico putativo en el dominio extracelular de un FGFR, que comprende el cribado con respecto a la presencia de dominios frustrados en dicho dominio extracelular usando un programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas, para identificar esos dominios, o fragmentos de los mismos, en dicho dominio extracelular que son propensos a sufrir transiciones de lámina  $\beta$  a hélice  $\alpha$ , o que tienen una estructura predicha por dicho programa de predicción de la estructura secundaria de proteínas que está en contradicción con la estructura real, que se determina mediante cristalización y difracción de rayos X, y la selección de los dominios o fragmentos así identificados para el cribado adicional para conformar la función del sitio del inhibidor putativo al diseñar compuestos tales como moléculas pequeñas, péptidos pequeños, peptidomiméticos, anticuerpos o nanocuerpos que se unen al sitio y de los que se puede probar la función del inhibidor alostérico.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que la función inhibidora del sitio de unión alostérico es una inhibición selectiva de rutas de señalización aguas abajo.
- 20 4. Un método para la identificación de un inhibidor alostérico de compuesto pequeño no polimérico de una RTK que se une a un sitio de inhibidor alostérico en el dominio extracelular de un receptor de tirosina cinasa, que comprende
- poner en contacto un sitio de unión alostérico de una RTK con el posible compuesto inhibidor alostérico de compuesto pequeño, y
  - comparar los cambios en el estado de al menos dos indicadores diferentes inducidos por dos rutas aguas abajo diferentes dependientes de la activación/inhibición de dicho receptor de tirosina cinasa,
- 25 en donde dicho inhibidor de compuesto pequeño no polimérico tiene un peso molecular de menos de 1.000 D.
- 30 5. Un método según la reivindicación 4, en el que un inhibidor alostérico se identifica cuando, en presencia de un ligando que se une al dominio de unión a ligando del receptor, al menos una ruta aguas abajo es inhibida mientras que al menos otra ruta aguas abajo queda inalterada.
- 35 6. Un método según la reivindicación 4 o 5, en el que la tirosina cinasa es un FGFR.
7. Un método según la reivindicación 6, en el que el FGFR se elige de uno de FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 o FGFR-4.
8. Un método para la identificación de un inhibidor alostérico de una RTK, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dichas dos rutas aguas abajo diferentes corresponden a la ruta de señalización de ERK1/2 y la ruta de señalización de PLC $\gamma$ .

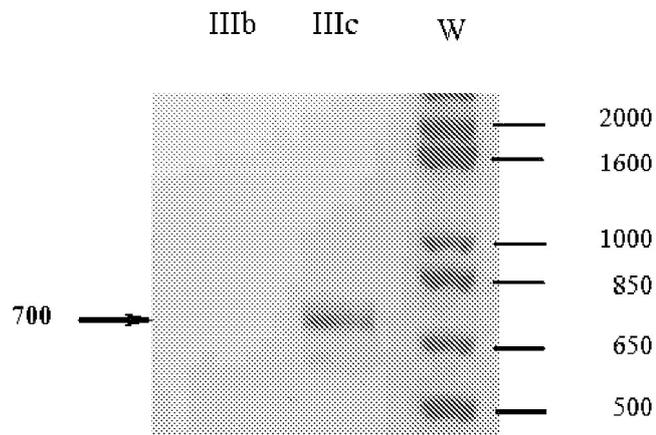
**A**



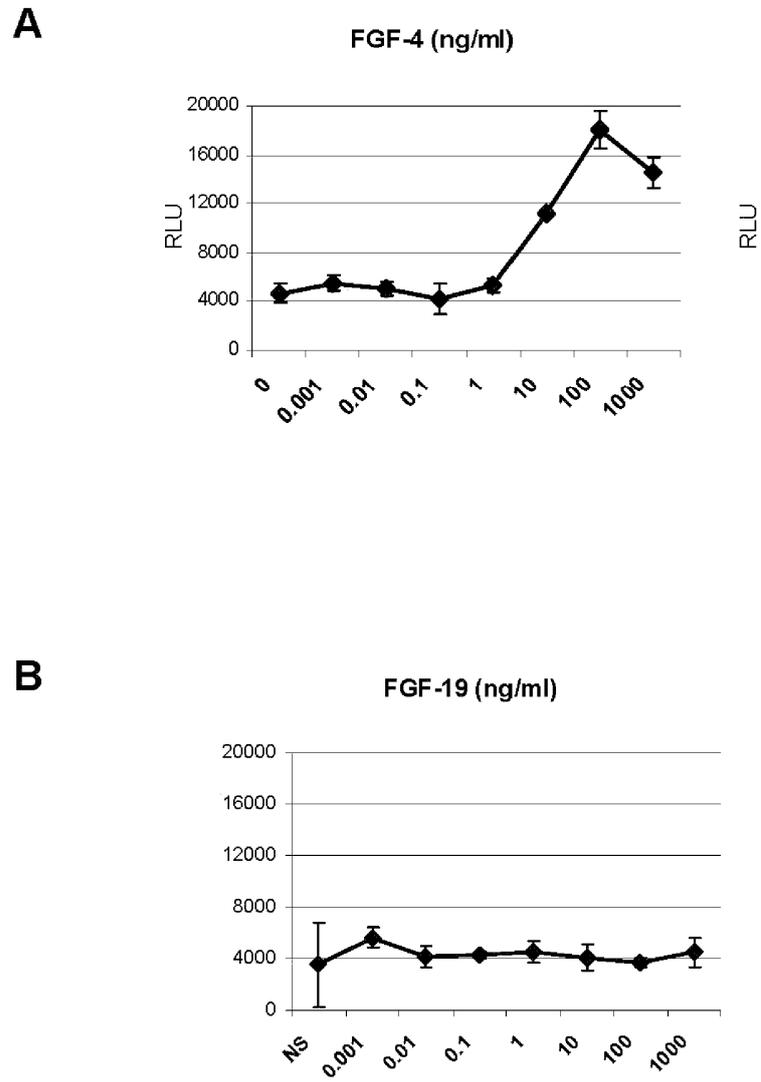
**B**



**C**



**Figura 1**



**Figura 2**

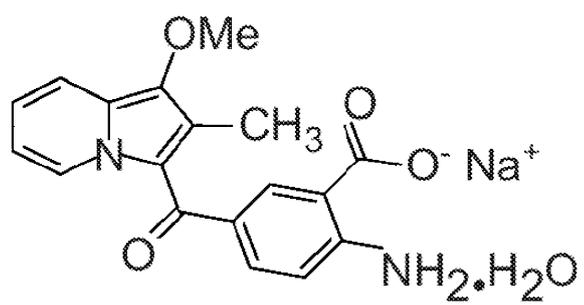
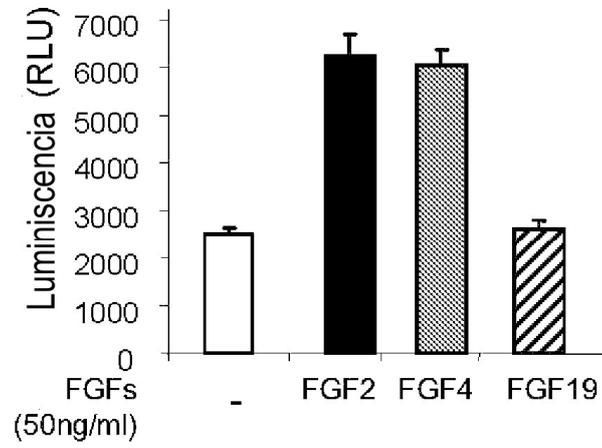
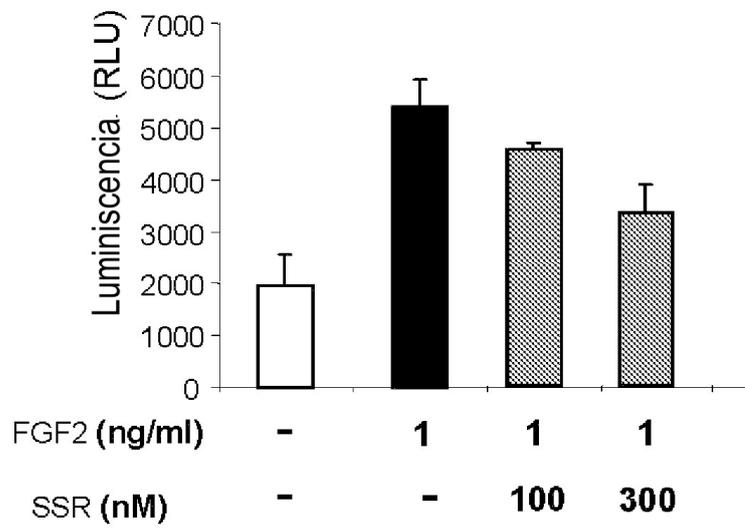


Figura 3

**A**

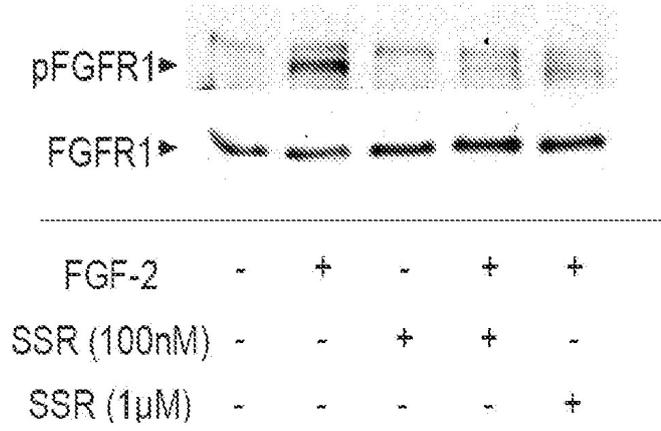


**B**

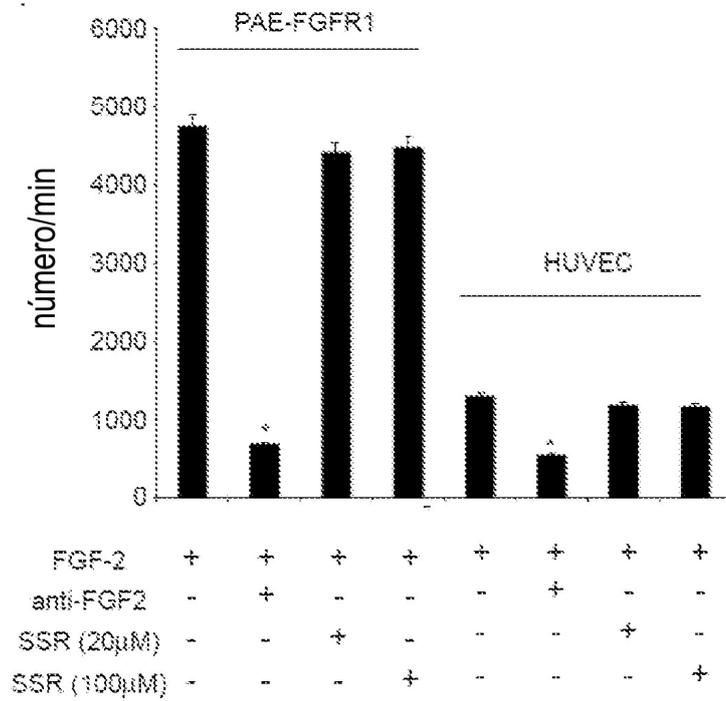


**Figura 4**

**C**



**D**



**Figura 4**

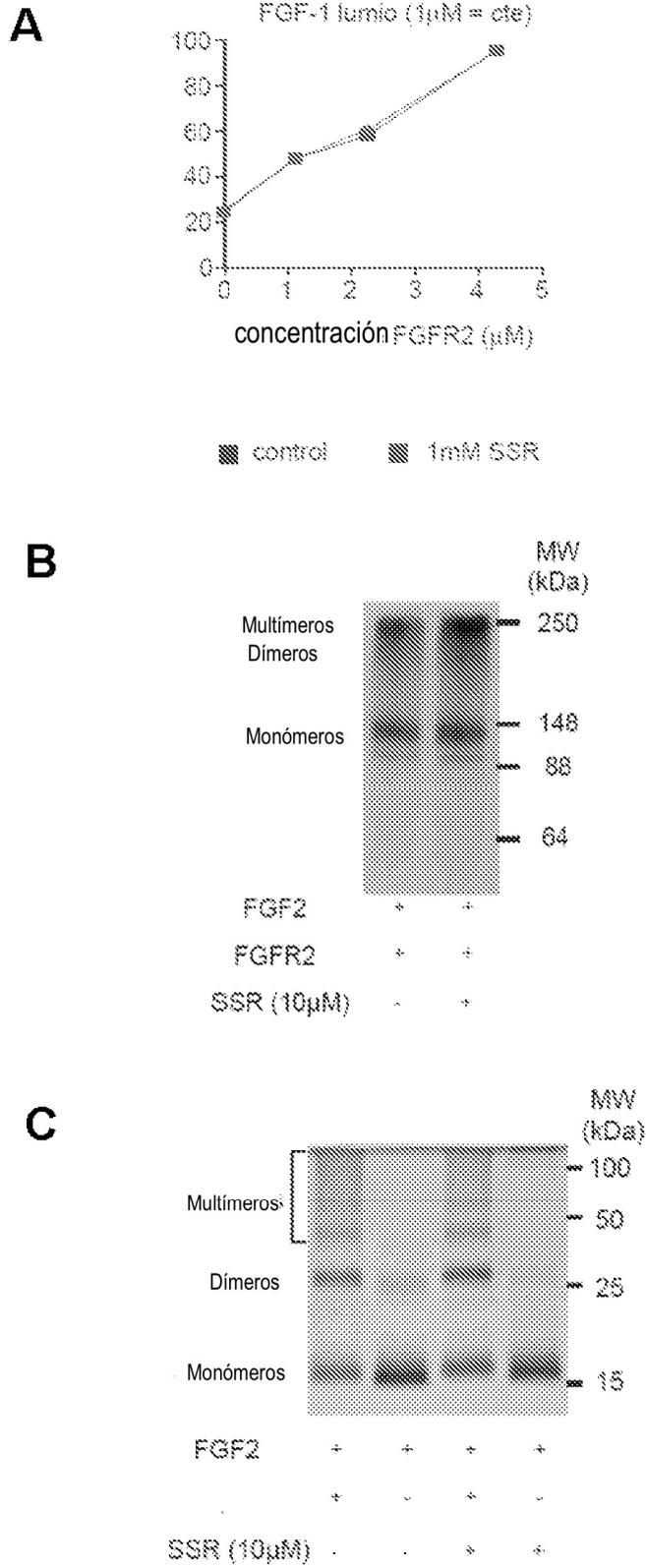
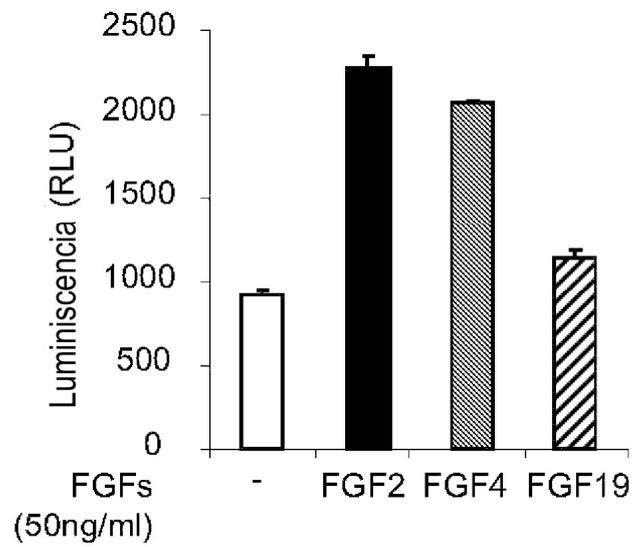
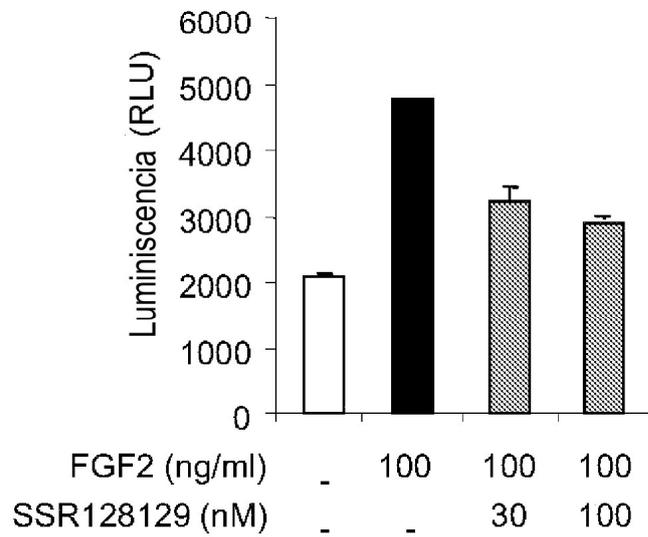


Figura 5

**A**

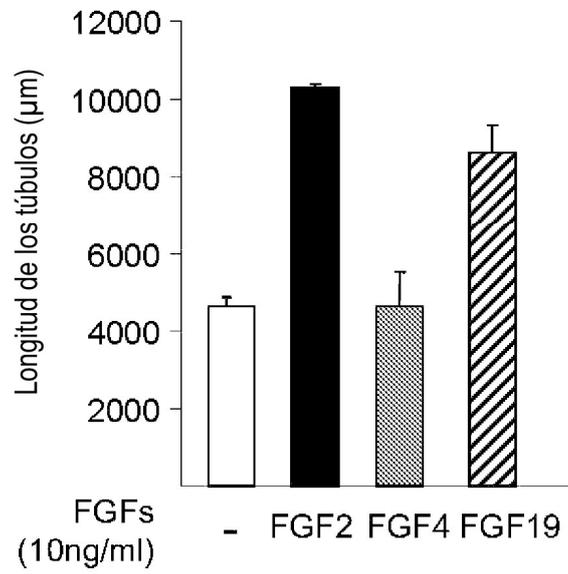


**B**

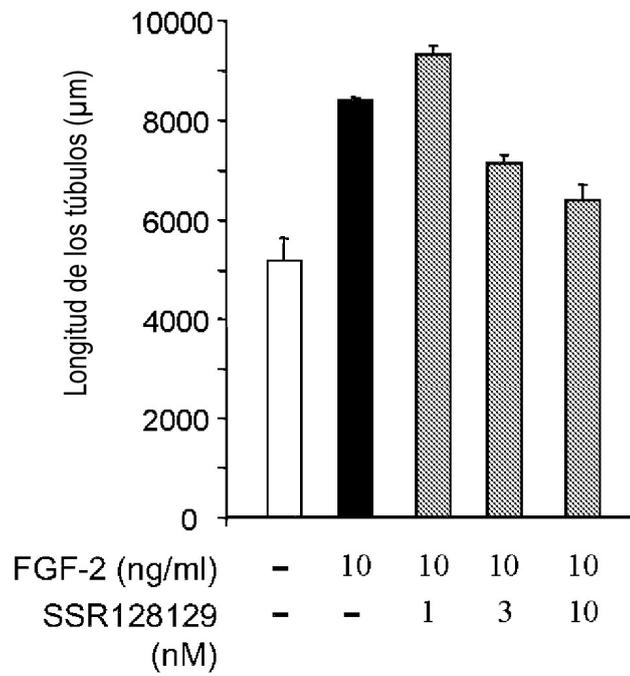


**Figura 6**

**A**

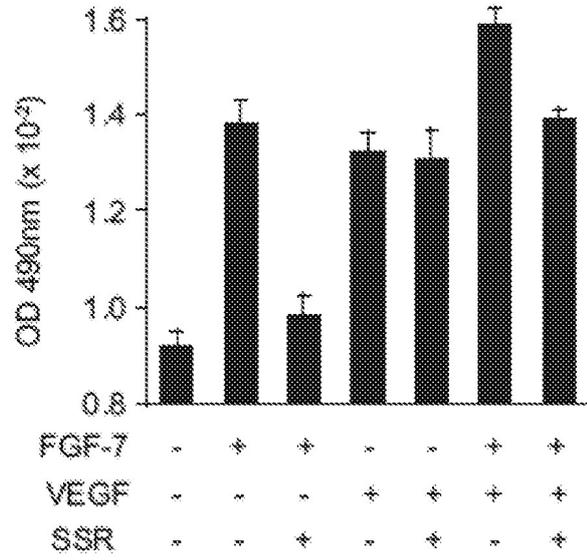


**B**



**Figura 7**

A



B

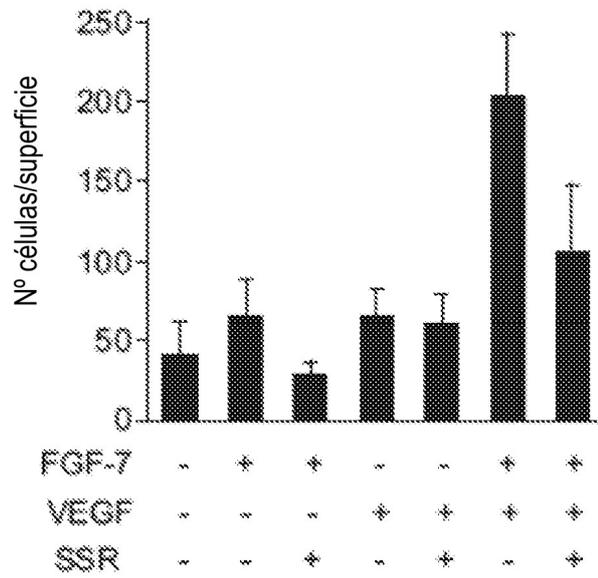
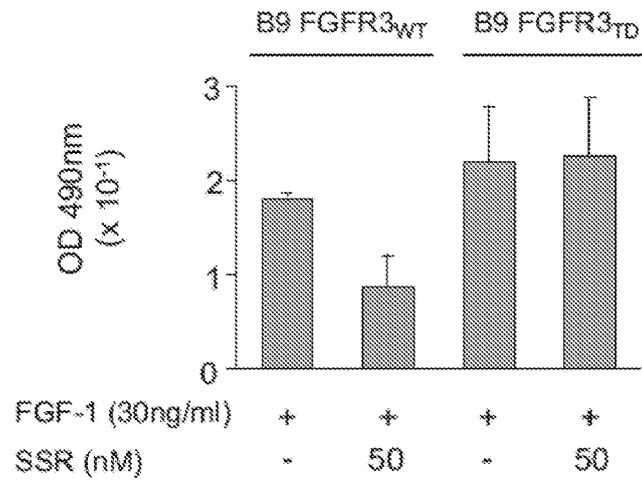


Figura 8



**Figura 9**

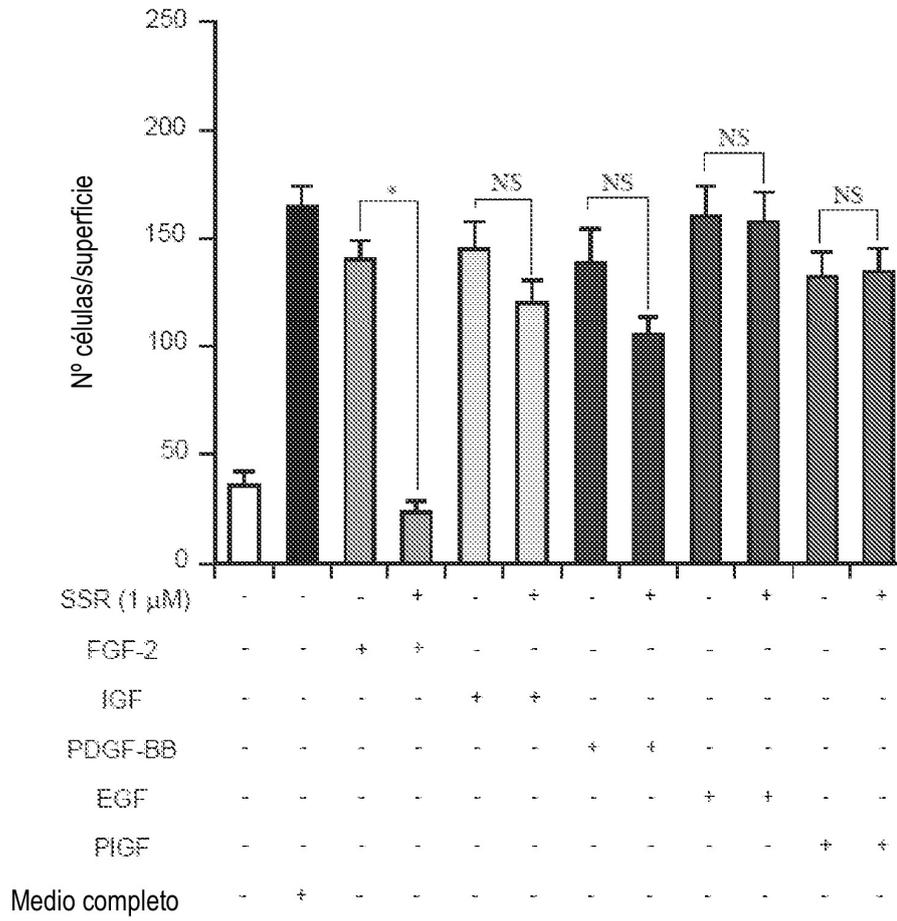
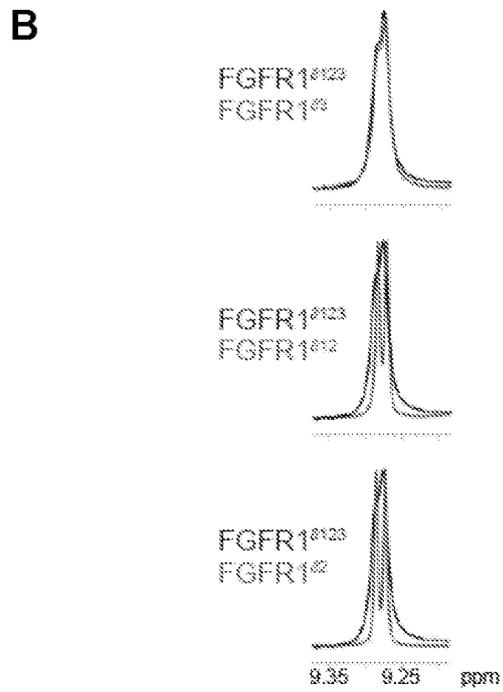
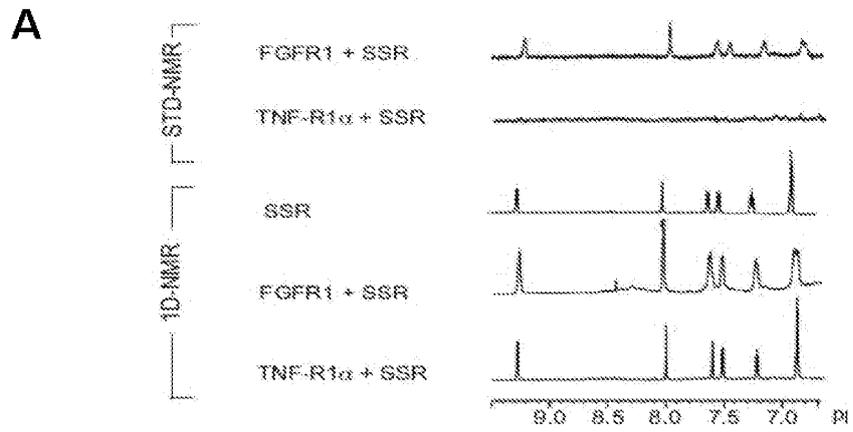
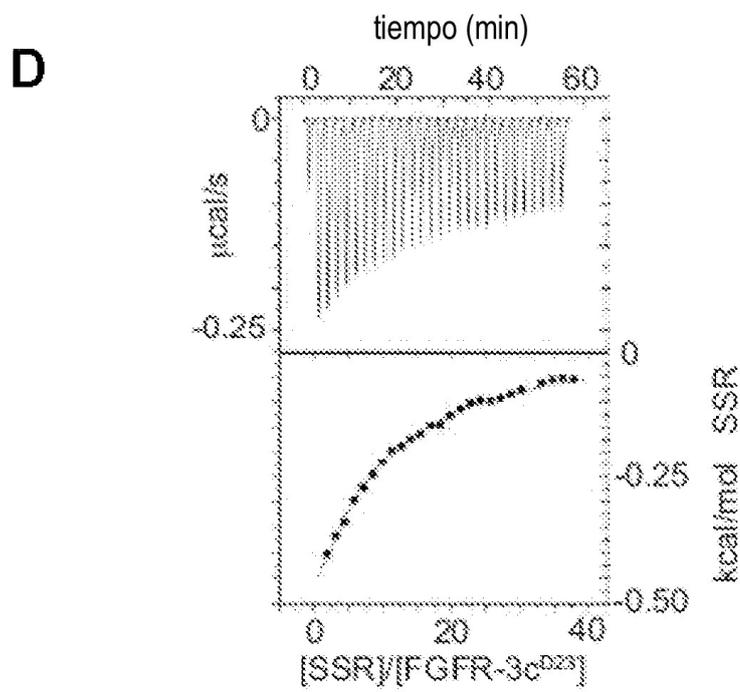
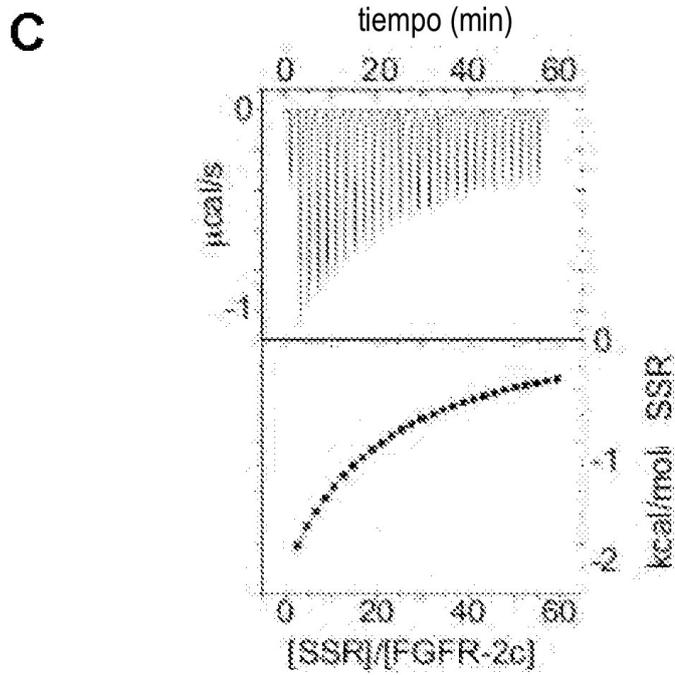


Figura 10

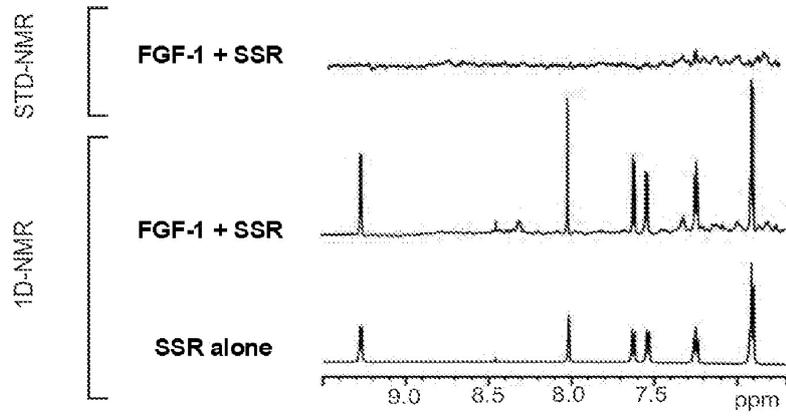


**Figura 11**

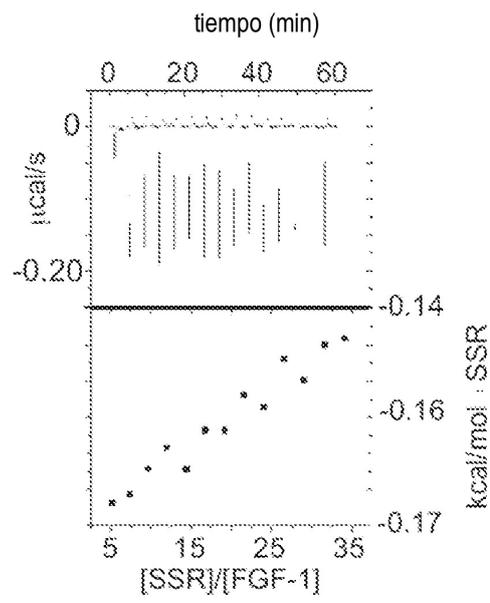


**Figura 11**

**A**

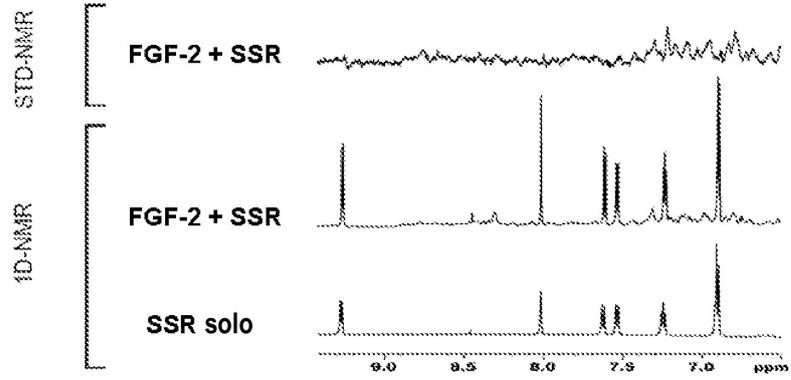


**B**

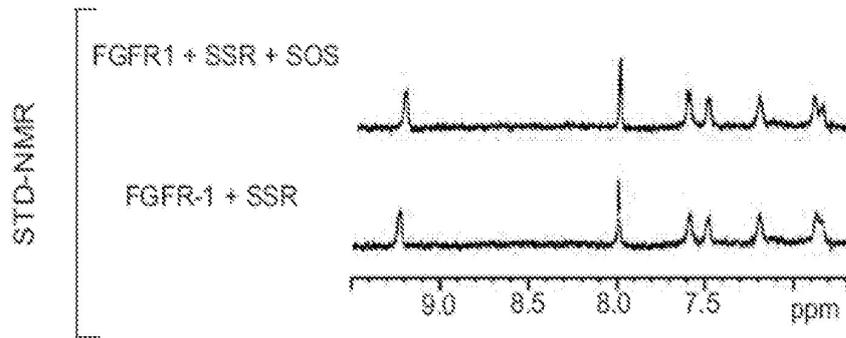


**Figura 12**

**C**

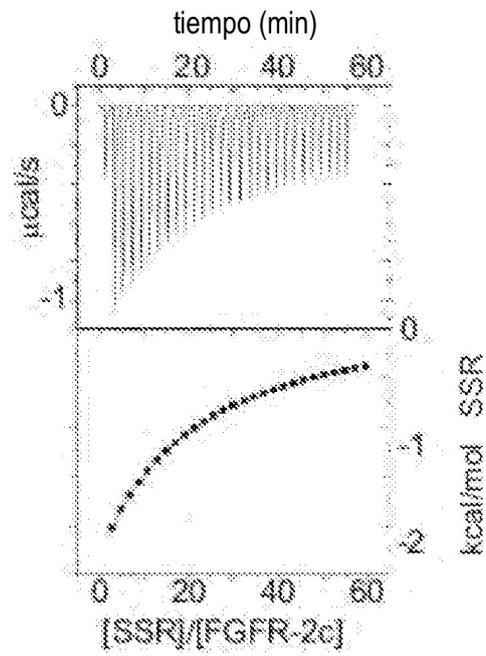


**D**

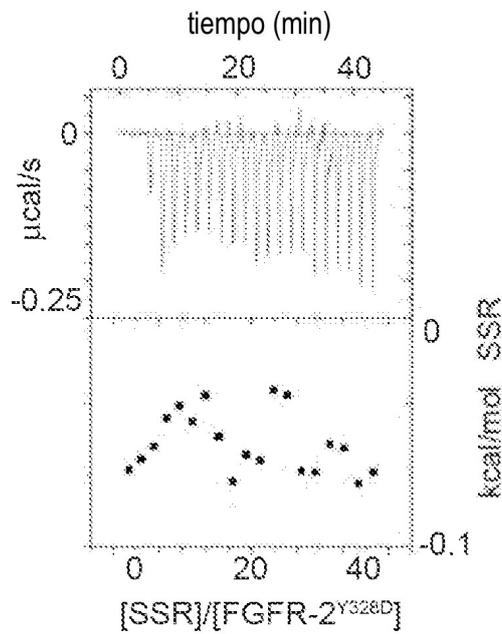


**Figura 12**

**A**



**B**



**Figura 13**

Medidas de FTIR

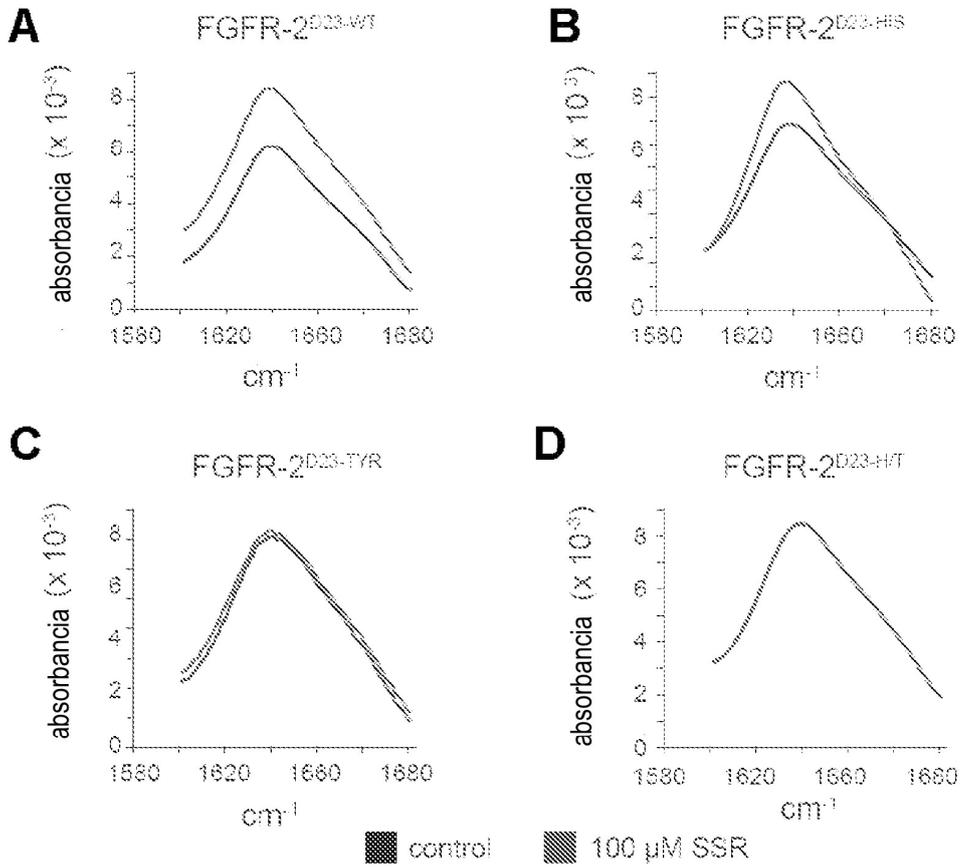
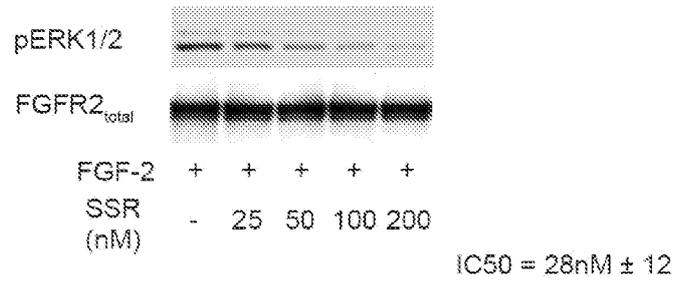
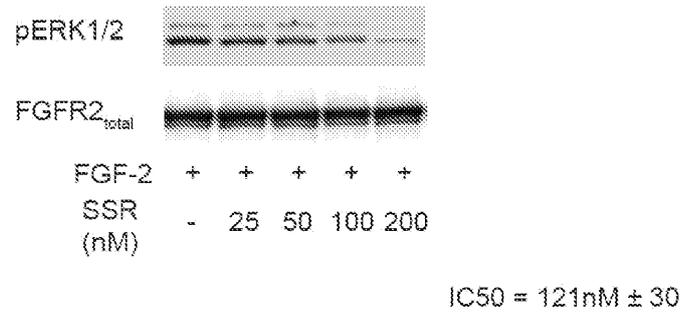


Figura 14

**A**

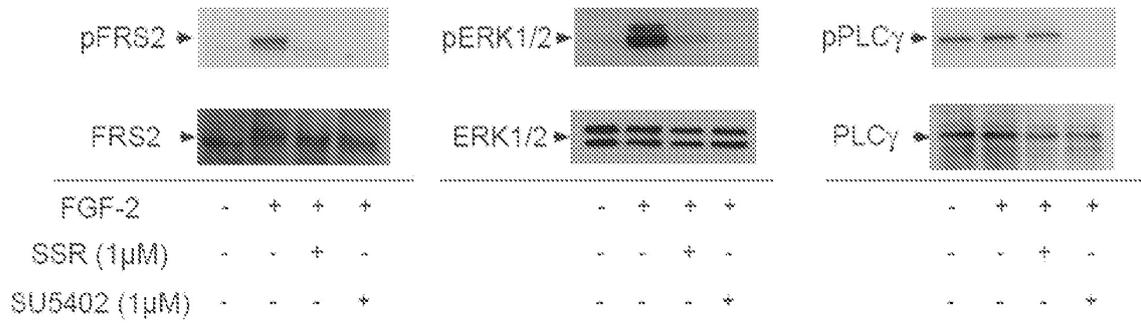


**B**

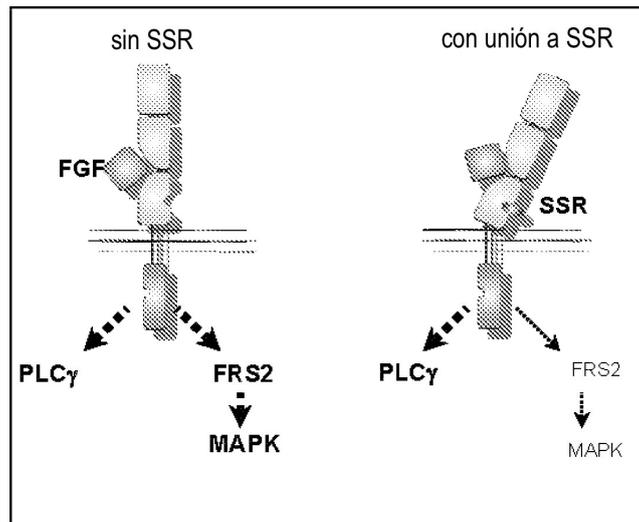


**Figura 15**

**A**

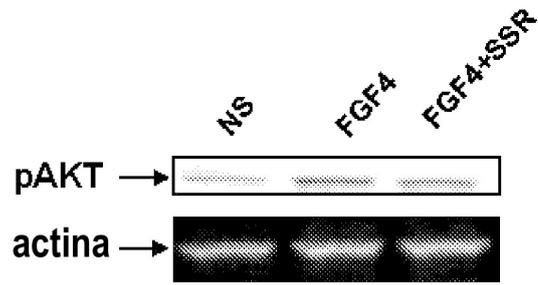


**B**

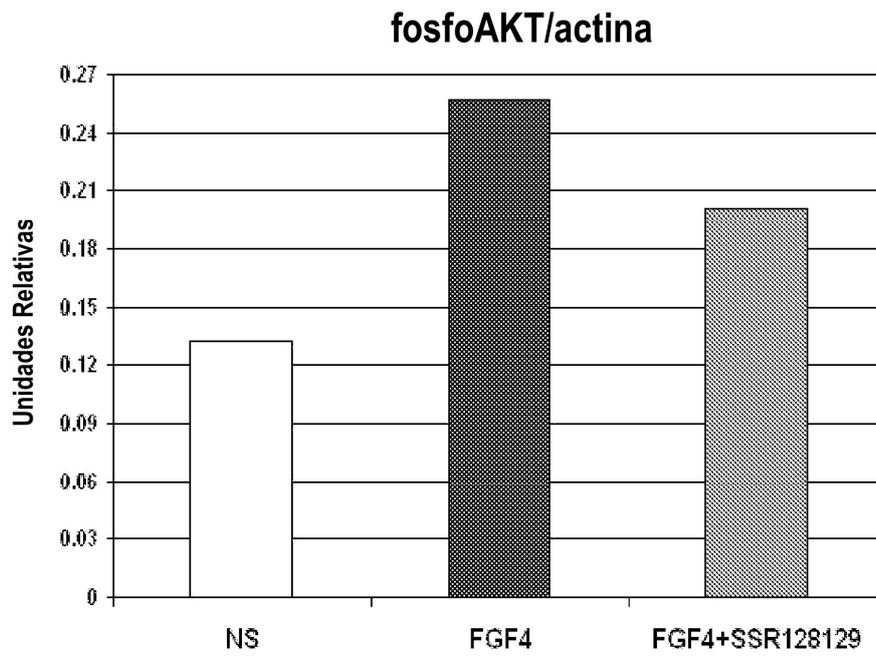


**Figura 16**

**A**

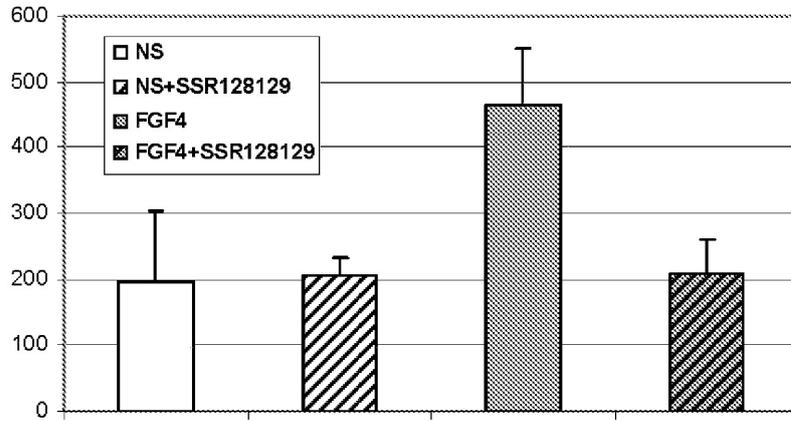


**B**

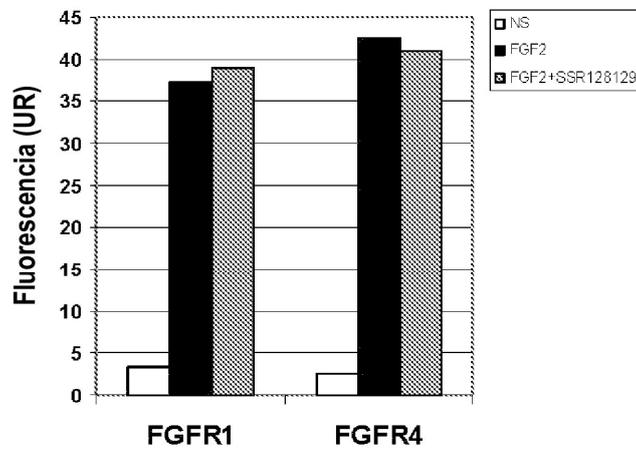


**Figura 17**

**C**

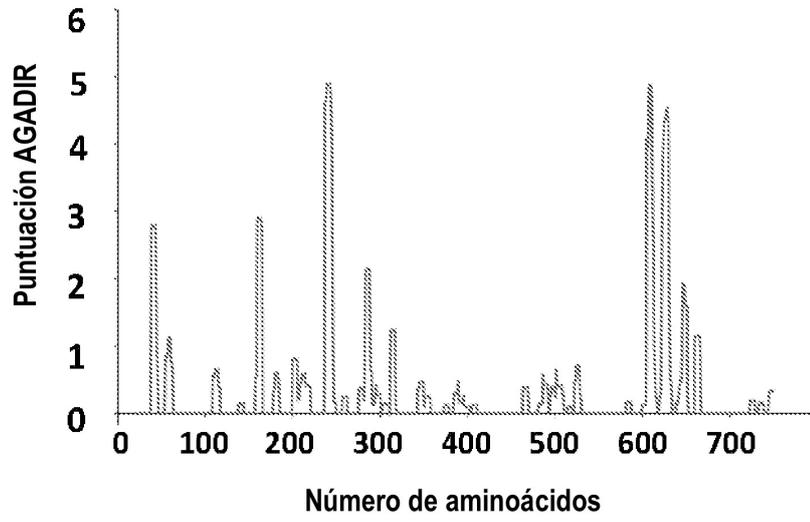


**D**

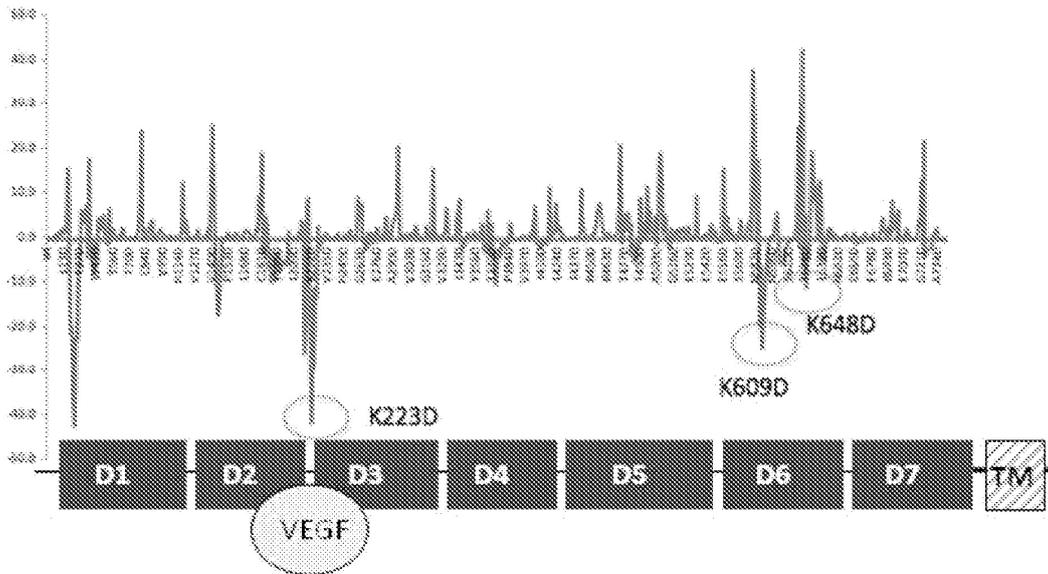


**Figura 17**

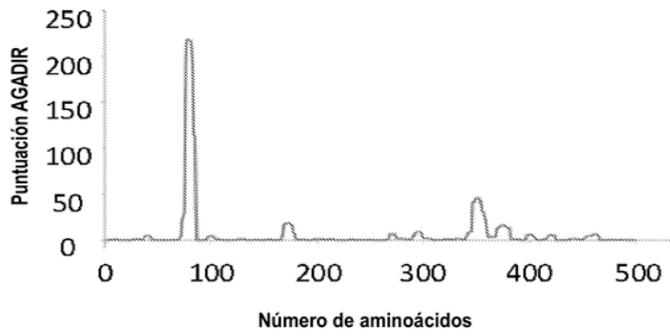
**A**



**B**



**Figura 18**



Cambio en la puntuación agadir cuando se muta el residuo a Aspartato (D)

hPDGFRbeta_K387D	-515.11
hPDGFRbeta_L383D	-485.6

**Figura 19**

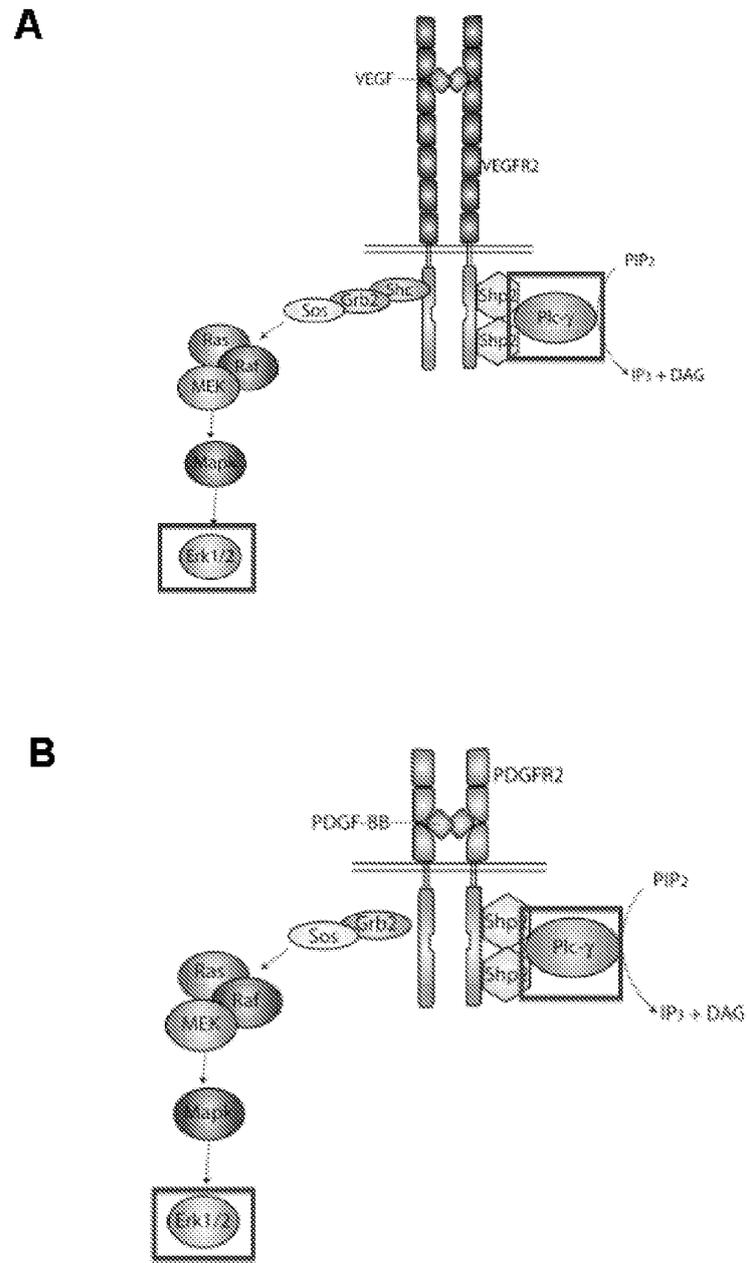
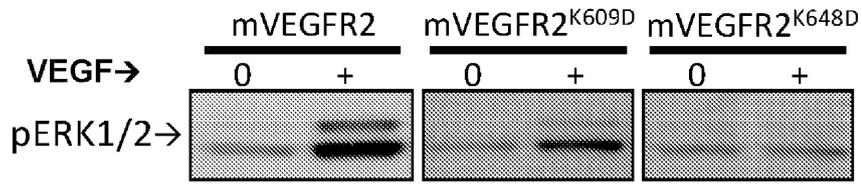
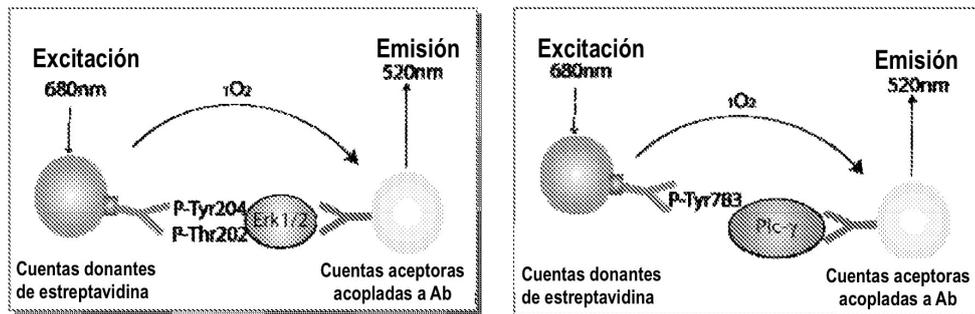


Figura 20

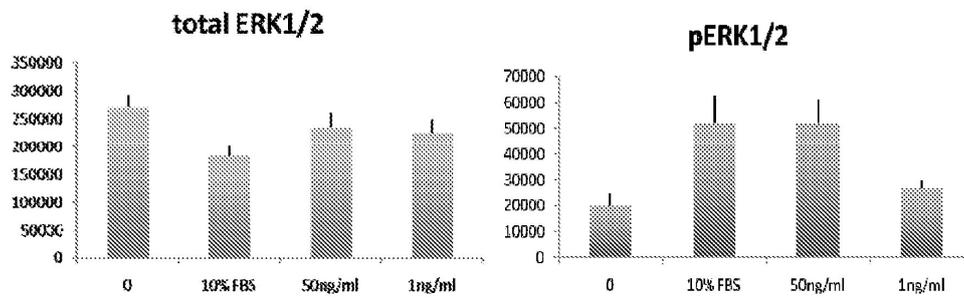
**A**



**B**



**C**



**Figura 21**