

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 499**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2012 PCT/EP2012/075294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012 E 12799204 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2790718**

54 Título: **Antagonista del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) para utilizar en el tratamiento o prevención de trastornos esqueléticos unidos con la activación anormal de FGFR3**

30 Prioridad:
12.12.2011 WO PCT/IB2011/003253

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2018

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (16.7%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (16.7%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (16.7%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (16.7%);
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (16.7%) y
IMAGINE (16.7%)**

72 Inventor/es:
**LEGEAI-MALLET, LAURENCE;
MUNNICH, ARNOLD;
BUSCA, PATRICIA y
BARBAULT, FLORENT**

74 Agente/Representante:
SALVA FERRER, Joan

Observaciones:

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

ES 2 668 499 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

Antagonista del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) para utilizar en el tratamiento o prevención de trastornos esqueléticos unidos con la activación anormal de FGFR3

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de trastornos esqueléticos, en particular enfermedades esqueléticas y craneosinostosis, desarrollados por pacientes que muestran un aumento de la activación anormal del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), en particular mediante la expresión de un mutante constitutivamente activado de FGFR3.

ANTECEDENTES

[0002] El desarrollo esquelético en seres humanos está regulado por numerosos factores de crecimiento. Entre ellos se ha descrito el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) como un regulador negativo y uno positivo de la osificación endocondral.

[0003] El gen *FGFR3*, que se encuentra en el brazo corto distal del cromosoma 4, codifica un precursor de la proteína de 806 aminoácidos (precursor de la isoforma 1 del receptor 3 de crecimiento de fibroblastos; SEQ ID NO: 1).

[0004] La proteína FGFR3 pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa. Esta familia comprende los receptores FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 que responden a ligandos de fibroblastos del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Estas proteínas estructuralmente relacionadas presentan un dominio extracelular compuesto de tres dominios de tipo inmunoglobulina que forman el dominio de unión a ligando, un cuadro ácido, un único dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa de división intracelular. Aunque hasta la fecha el ligando o ligandos fisiológicos para FGFR3 no son conocidos, como otros FGFR, es activado por ligandos FGF. La unión de uno de los 22 FGF induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplásmico. Se requieren los residuos de tirosina fosforilados para la activación de las vías de señalización. Las tirosinas más relevantes son Y648, Y647, situadas en el bucle de activación.

[0005] Varias rutas de señalización se han descrito aguas abajo de la activación de FGFR3, incluyendo las vías de ERK y p38 MAP quinasa (Legeai-Mallet et al, J Biol Chem, 273: 13007-13014, 1998; Murakami et al, Genes Dev, 18: 290-305, 2004; Matsushita et al, Hum Mol Genet., 18: 227-240, 2009; Krejci et al, J Cell Sci, 121: 272-281, 2008) y la vía de transductor de señal y activación de la transcripción (STAT) (Su, W.C. et al., Nature, 386: 288-292, 1997; Legeai-Mallet et al, Bone, 34: 26-3, 2004; Li, C. et al, Hum Mol Genet., 8: 35-44, 1999). Se han identificado otras vías en el crecimiento de hueso endocondral, tal como las vías de fosfoinosítido 3 quinasa AKT (Ulici, V. et al, Bone, 45: 1133-1145, 2009) y proteína quinasa C. La degradación de los receptores mutantes se altera como se demuestra por los niveles más altos de receptores mutantes FGFR3 en la superficie celular (Monsonogo-Ornán et al, Mol Cell Biol., 20: 516-522, 2000; Monsonogo-Ornán et al, FEBS Lett, 528: 83-89, 2002; Delezoide et al, Hum Mol Genet, 6: 1899-1906, 1997), y la interrupción de la ubiquitinación mediada por c-Cbl (Cho, J.Y. et al, Proc Natl Acad Sci USA, 101 : 609-614, 2004). Las mutaciones de FGFR3 alteran la formación de isoformas glicosiladas del receptor e impiden su tráfico (Gibbs et al, Biochim Biophys Acta, 1773: 502-512, 2007; Bonaventure et al, FEBS J, 274: 3078 a 3.093, 2007).

[0006] Aunque el desarrollo de huesos largos implica osificación endocondral, el desarrollo craneofacial depende de osificación endocondral y membranosa.

[0007] En la bóveda del cráneo, el FGFR3 activado induce craneosinostosis. Esta enfermedad consiste en la fusión prematura de una o más de las suturas craneales. Dos mutaciones de FGFR3 causan craneoestenosis específica, síndrome de Muenke y síndrome de Crouzon con acantosis nigricans. Estas enfermedades son un trastorno hereditario autosómico dominante.

[0008] En el hueso largo, el FGFR3, cuando se activa, ejerce una influencia reguladora negativa principalmente en la fase de crecimiento, en la que se reduce el recambio necesario para la elongación de hueso, la velocidad de formación de plantilla de cartílago e interrumpe la proliferación y la diferenciación de condrocitos.

[0009] La sobreactivación de FGFR3 anormal o la activación constitutiva de FGFR3 conduce a una desorganización grave del cartílago de la placa de crecimiento. La ganancia de mutantes de función de FGFR3 (también llamados "mutantes constitutivamente activos de FGFR3") interrumpen la osificación endocondral en un espectro de displasias esqueléticas que incluyen acondroplasia (ACH), la forma más común de enanismo humano, hipcondroplasia (HCH), y displasia tanatófica (TD), la forma más común de displasia esquelética letal. Por el contrario, se ha demostrado que los ratones knock-out en *FGFR3* y seres humanos sin FGFR3 funcional muestran sobrecrecimiento esquelético.

[0010] Por lo tanto, las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 (por ejemplo, displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 y craniosinostosis relacionada con FGFR3) son el resultado del aumento de la transducción de señales del receptor activado.

5 **[0011]** Entre las displasias esqueléticas, la acondroplasia es de particular interés ya que es una de las enfermedades congénitas más comunes responsables del enanismo, trastorno caracterizado por extremidades cortas en relación con el tronco. Se diagnostica por la falta de crecimiento en los ejes mayores de los huesos largos de las extremidades y características físicas típicas, tales como un cráneo con gran proyección frontal y una nariz corta. Esta enfermedad es un trastorno hereditario autosómico dominante, pero la mayoría de los casos se encuentra que es esporádica. La hipocondroplasia también se caracteriza por una estatura corta con brazos y piernas desproporcionadamente cortas. Las características del esqueleto son muy similares a la acondroplasia, pero por lo general tienden a ser más leves.

15 **[0012]** Las terapias actuales de la acondroplasia y la hipocondroplasia incluyen cirugías ortopédicas, tales como alargamiento de la pierna y terapia con hormonas de crecimiento. Sin embargo, el alargamiento de las piernas inflige un gran dolor en los pacientes, y la terapia con hormonas del crecimiento aumenta la altura del cuerpo por medio de inyecciones periódicas de hormona de crecimiento a partir de la infancia. Además, el crecimiento cesa cuando se detienen las inyecciones.

20 **[0013]** En consecuencia, es deseable desarrollar una nueva terapia para la acondroplasia y la hipocondroplasia e identificar moléculas adecuadas para el tratamiento de la acondroplasia y la hipocondroplasia, así como otras enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3, tales como craniosinostosis relacionada con FGFR3.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 **[0014]** En un intento por encontrar un nuevo tratamiento para enfermedades esqueléticas, los inventores tuvieron éxito en la restauración de crecimiento óseo mediante la administración de inhibidores de la tirosina quinasa, más particularmente inhibidores que son capaces de inhibir la auto-fosforilación de FGFR3. De hecho, los inventores han demostrado en un modelo ex vivo (que consiste en el cultivo de fémures de ratones enanos embrionario que muestran un deterioro de la osificación endocondral) que los inhibidores de tirosina quinasa (especialmente aquellos que impiden que el ATP se una al "sitio de unión a ATP" de FGFR3) restauran un crecimiento normal de los huesos. Además, los inventores han demostrado in vivo en un modelo animal que la administración de inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo, compuestos que pertenecen a la clase de pirido [2,3-d]pirimidina y a la clase N-aril-N'-pirimidin-4-il urea) mejora la condición de enanismo mediante el aumento de crecimiento de los huesos.

35 **[0015]** En consecuencia, los inhibidores de FGFR3 son útiles para el tratamiento de enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3.

40 **[0016]** Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 que comprende la etapa de administrar al menos un antagonista del receptor de tirosina quinasa FGFR3, tal como se define en las reivindicaciones, o una composición que comprende dicho antagonista, a un sujeto en necesidad del mismo.

45 **[0017]** La presente invención también se refiere a un antagonista del FGFR3, tal como se define en la reivindicación, o una composición que comprende dicho antagonista, para usar en el tratamiento o prevención de enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3.

50 **[0018]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "FGFR3", "receptor de tirosina quinasa FGFR3" y "receptor FGFR3" se utilizan indistintamente en toda la memoria y se refieren a todas las isoformas de origen natural de FGFR3.

[0019] En particular, un antagonista de un receptor de tirosina quinasa FGFR3 se refiere a un antagonista capaz de inhibir o bloquear la actividad de:

- 55 a) un polipéptido FGFR3 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la referencia de NCBI NP_000133 y en la referencia UniProt P22607 (secuencia de SEQ ID NO: 1); y/o
 b) un FGFR3 correspondiente a la isoforma madura de un polipéptido FGFR3 de (a) (es decir, obtenido después de la escisión del péptido señal); y/o
 c) una variante alélica de un FGFR3 de (a) o (b); y/o
 d) una variante de empalme de un FGFR3 de (a), (b) o (c); y/o
 60 e) un mutante constitutivamente activo de un FGFR3 de (a), (b), (c) o (d),
 f) una isoforma obtenida por procesamiento proteolítico de un FGFR3 de (a), (b), (c), (d) o (e).

65 **[0020]** Como se usa en el presente documento, las expresiones "variante de receptor FGFR3 constitutivamente activa", "mutante constitutivamente activo del FGFR3" o "FGFR3 mutante que muestra una actividad constitutiva" se usan indistintamente y se refieren a un mutante de dicho receptor que presenta una actividad biológica (es decir, la activación de señalización aguas abajo) en ausencia de estimulación de ligando FGF, y/o que presenta una actividad

biológica que es mayor que la actividad biológica del correspondiente receptor de tipo natural en presencia de ligando FGF.

- 5 **[0021]** Una variante de FGFR3 constitutivamente activa de acuerdo con la invención se selecciona en particular del grupo que consiste en (los residuos se numeran según su posición en el precursor de la isoforma 1 del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos - 806 aminoácidos de longitud):
- un mutante en el que el residuo de serina en la posición 84 está sustituido por lisina (denominado en el presente documento a continuación S84L);
 - un mutante en el que el residuo de arginina en la posición 248 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como R200C);
 - 10 - un mutante en el que el residuo de arginina en la posición 248 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como R248C);
 - un mutante en el que el residuo de serina en la posición 249 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como S249C);
 - 15 - un mutante en el que el residuo de prolina en la posición 250 está sustituido por arginina (denominado en el presente documento a continuación como P250R);
 - un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 262 está sustituido por histidina (denominado en el presente documento a continuación como N262H);
 - un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 268 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como G268C);
 - 20 - un mutante en el que el residuo de tirosina en la posición 278 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como Y278C);
 - un mutante en el que el residuo de serina en la posición 279 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como S279C);
 - 25 - un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 370 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como G370C);
 - un mutante en el que el residuo de serina en la posición 371 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como S371C);
 - un mutante en el que el residuo de tirosina en la posición 373 está sustituido por cisteína (denominado en el presente documento a continuación como Y373C);
 - 30 - un mutante en el que el residuo de glicina en la posición 380 está sustituido por arginina (denominado en el presente documento a continuación como G380R);
 - un mutante en el que el residuo de valina en la posición 381 está sustituido por glutamato (denominado en el presente documento a continuación como V381E);
 - 35 - un mutante en el que el residuo de alanina en la posición 391 está sustituido por glutamato (denominado en el presente documento a continuación como A391E);
 - un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 540 está sustituido por lisina (denominado en el presente documento a continuación como N540K);
 - un mutante en el que el codón de terminación se elimina debido a sustituciones de bases, en particular, el mutante en el que el codón de terminación está mutado en un codón de arginina, cisteína, glicina, serina o triptófano (denominado en el presente documento a continuación como X807R, X807C, X807G, X807S y X807W, respectivamente);
 - 40 - un mutante en el que el residuo de lisina en la posición 650 está sustituido por otro residuo, en particular por metionina, glutamato, asparagina o glutamina (denominado en el presente documento a continuación como K650M, K650E, K650N y K650Q).
 - 45

[0022] Preferiblemente, una variante de FGFR3 constitutivamente activa de acuerdo con la invención es un mutante K650M, K650E o Y373C.

- 50 **[0023]** En el contexto de la presente invención, el término "enfermedad esquelética relacionada con FGFR3" pretende significar una enfermedad esquelética que es causada por un aumento de la activación anormal de FGFR3, en particular, por la expresión de un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3, en particular, un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3, tal como se describe anteriormente.

- 55 **[0024]** Las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 son preferiblemente displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 y craneosinostosis relacionadas con FGFR3.

[0025] Las displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 según la invención pueden corresponder a una enfermedad heredada o a una enfermedad esporádica.

- 60 **[0026]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3" incluye pero no se limita a displasia tanatofórica de tipo I, displasia tanatofórica tipo II, hipocondroplasia, acondroplasia y SADDAN (acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acanthosis nigricans).

- 65 **[0027]** En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es causada por la expresión en el sujeto de una variante del receptor FGFR3 constitutivamente activa, tal como se define anteriormente.

[0028] En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una acondroplasia causada por la expresión del mutante G380R constitutivamente activo del receptor FGFR3.

5 [0029] En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una hipocondroplasia causada por la expresión del mutante N540K, K650N, K650Q, S84L, R200C, N262H, G268C, Y278C, S279C, V381E, constitutivamente activo del receptor FGFR3.

10 [0030] En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica de tipo I causada por la expresión de un mutante constitutivamente activo del receptor FGFR3 elegido del grupo que consiste en los receptores FGFR3 R248C, S248C, G370C, S371C; Y373C, X807R, X807C, X807G, X807S, X807W y K650M.

15 [0031] En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica de tipo II causada por la expresión del mutante K650E constitutivamente activo del receptor FGFR3.

[0032] En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acanthosis nigricans causada por la expresión del mutante K650M constitutivamente activo del receptor FGFR3.

20 [0033] La craneosinostosis relacionada con FGFR3 según la invención puede corresponder a una enfermedad heredada o a una enfermedad esporádica.

25 [0034] En una realización preferida, la craneosinostosis relacionada con FGFR3 es el síndrome de Muenke causado por la expresión del mutante P250R constitutivamente activo del receptor FGFR3 o el síndrome de Crouzon con acantosis nigricans causado por la expresión del mutante A391G constitutivamente activo del receptor FGFR3.

30 [0035] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antagonista" se refiere a un agente (es decir, una molécula) que inhibe o bloquea la actividad de FGFR3. Por ejemplo, un antagonista de FGFR3 se refiere a una molécula que inhibe o bloquea la actividad del receptor FGFR3. Preferiblemente, los antagonistas de FGFR3 de acuerdo con la descripción actúan mediante la interacción directa con el receptor FGFR3.

35 [0036] Los antagonistas de la presente descripción actúan mediante el bloqueo o la reducción de la activación funcional del receptor FGFR3. Esto puede lograrse por ejemplo mediante la interferencia con la unión del ligando de FGF a receptor FGFR3 o con la unión de ATP a "sitio de unión a ATP" de receptor FGFR3 para la prevención de la fosforilación de residuos de tirosina situados hacia el dominio citoplásmico (bucle de activación), es decir, en Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷.

40 [0037] Alternativamente, esto se puede conseguir mediante la reducción o la prevención de la expresión del receptor FGFR3.

45 [0038] El término "expresión" cuando se usa en el contexto de expresión de un gen o ácido nucleico se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína (es decir, FGFR3) producido mediante traducción de un ARNm.

50 [0039] Ambas opciones finalmente dan lugar al bloqueo o la reducción de la transducción de señales, por lo tanto, en el bloqueo o la reducción de la actividad funcional de los receptores.

55 [0040] Los antagonistas de acuerdo con la descripción son capaces de inhibir o eliminar la activación funcional del receptor FGFR3 in vivo y/o in vitro. El antagonista puede inhibir la activación funcional del receptor FGFR3 en al menos aproximadamente 10%, preferiblemente en al menos aproximadamente 30%, preferiblemente en al menos aproximadamente 50%, preferiblemente en al menos aproximadamente 70, 75 o 80%, aún más preferiblemente en 85, 90, 95, o 100%.

60 [0041] Preferiblemente, los antagonistas de acuerdo con la descripción son más específicos para FGFR3 frente a FGFR1, 2 y 4, por ejemplo, la consante del inhibidor "KI" de los antagonistas para FGFR3 es al menos 2, preferiblemente 5, más preferiblemente 10, veces inferior que la KI para al menos uno de FGFR1, 2 y 4.

65 [0042] Los antagonistas para el receptor FGFR3 son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-FGFR3, por ejemplo los anticuerpos descritos por Rauchenberger, R. et al. (J. Biol Chem 3 Oct. 2003; 278 (40): 38194-205), Martínez-Torrecauadrada, J., et al. (Clin Cancer Res 1 Sep 2005; 11 (17): 6280-90), Trudel S., et al. (Blood 15 mayo 2006; 107 (10): 4039-46), Qing J. et al. (J. Clin Invest 2009, 119 (5): 1216-1229), los anticuerpos anti-FGFR3 descritos en IN2011CN02023, WO2010/111367, US 2010/0098696, WO2010/02862, WO2007/144893, WO2002/102973.

[0043] Los antagonistas para el receptor FGFR3 también incluyen pequeñas moléculas químicas, por ejemplo las descritas en WO2010/22169 (por ejemplo, el compuesto de fórmula general 1 que corresponde a ácido 4,4',4",4'''-[carbonil-bis[imino-5,1,3-bis-bencenotriil bis-{carbonilimino}]3tetraakis-{benceno-1,3-disulfónico}), WO2007/26251, WO2005/47244, US2005/261307, así como compuestos de ácido nucleico para la regulación/inhibición de la expresión de FGFR3 descritos en WO2003/23004, US2007/049545 y WO2011/139843.

[0044] La activación funcional del receptor FGFR3 puede evaluarse fácilmente por el experto en la técnica de acuerdo con procedimientos conocidos. De hecho, dado que el receptor FGFR3 activado se fosforila en residuos de tirosina situados hacia el dominio citoplásmico, es decir, en Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷, la activación funcional del receptor FGFR3 puede, por ejemplo, ser evaluada mediante la medición de su fosforilación.

[0045] Por ejemplo, el análisis de la fosforilación inducida por ligando del receptor FGFR3 se puede realizar como se describe en Le Corre et al. (Org Biomol Chem., 8: 2164-2173, 2010).

[0046] Alternativamente, la fosforilación del receptor en las células se puede detectar fácilmente por inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo utilizando anticuerpos que reconocen específicamente esta modificación. Por ejemplo, la fosforilación de FGFR3 en los residuos Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷ puede ser detectada por inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷-FGFR3 fosforiladas.

[0047] La activación funcional del receptor FGFR3 también se puede ensayar mediante el uso de líneas celulares dependientes de FGFR3 (por ejemplo la línea celular BaF3). La actividad antagonista de FGFR3 de un compuesto se determina midiendo su capacidad para inhibir la proliferación de una línea celular dependiente de FGFR3 (ver procedimientos descritos por Vito Guagnano et al, Journal of Medicinal Chemistry, 54: 7066-7083, 2011).

[0048] Además, FGFR3, cuando se asocia con su ligando, media en la señalización mediante la activación de las vías de ERK y p38 MAP quinasa y la vía STAT. Por lo tanto, la activación del receptor FGFR3 también se puede evaluar mediante la determinación de la activación de estas vías específicas, tal como se describe por Horton et al. (Lancet, 370: 162-172, 2007)

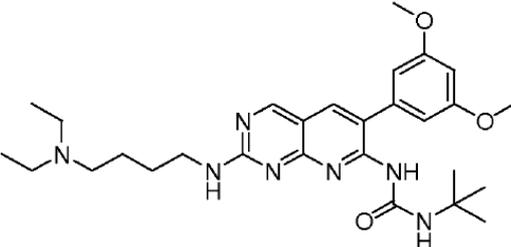
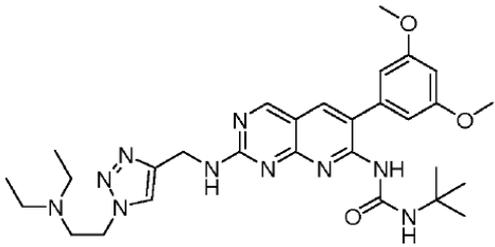
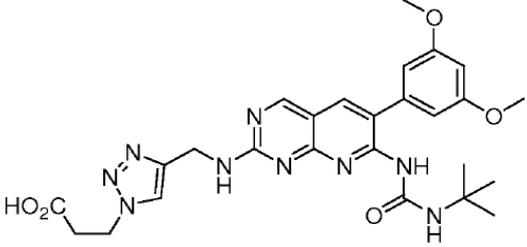
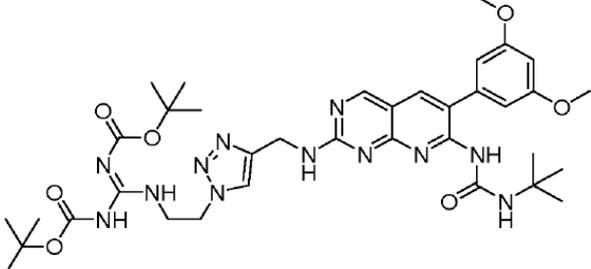
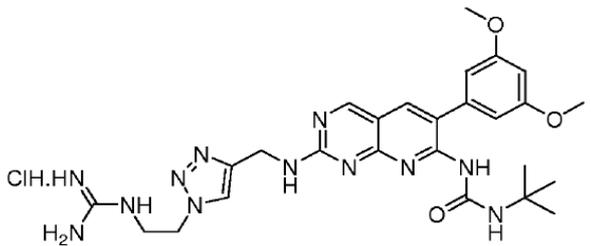
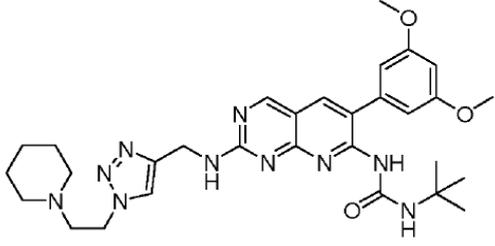
[0049] Por consiguiente, un antagonista puede identificarse como una molécula que reduce el nivel de fosforilación del receptor a ensayar tras la estimulación con su ligando específico de una célula que expresa dicho receptor, en comparación con el nivel de fosforilación del receptor medido en la célula cuando se estimula con su ligando específico en ausencia del antagonista.

[0050] Los antagonistas de acuerdo con la presente descripción incluyen aquellos que se unen específicamente al receptor FGFR3, reduciendo o bloqueando así la transducción de señales. Los antagonistas de este tipo incluyen anticuerpos (en particular, los anticuerpos como se describen anteriormente) o aptámeros que se unen a FGFR3, polipéptidos de fusión, péptidos, pequeñas moléculas químicas que se unen a FGFR3, y peptidomiméticos.

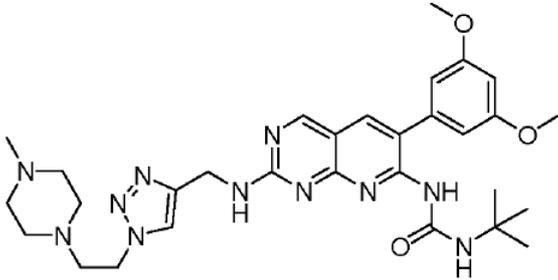
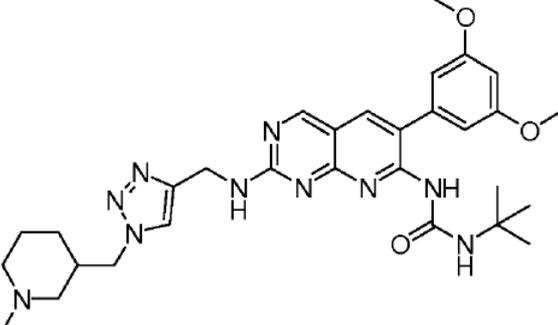
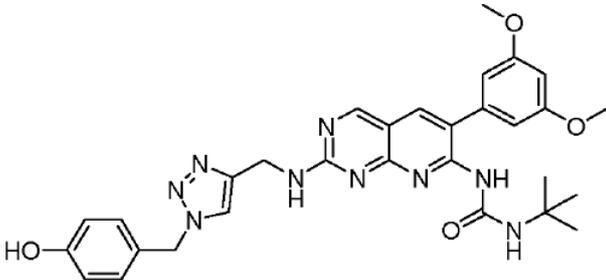
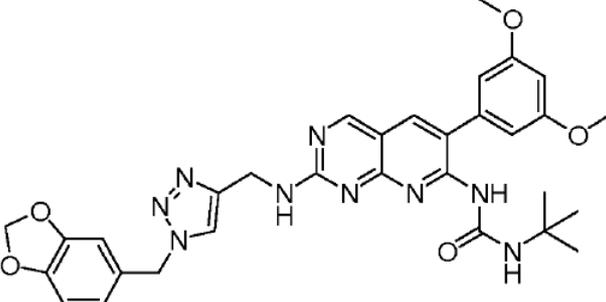
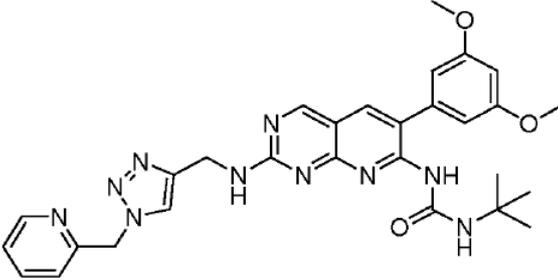
[0051] El término "pequeña molécula química" se refiere a una molécula, preferiblemente de menos de 1.000 daltons, en compuestos inorgánicos u orgánicos particulares. El diseño estructural en química debería ayudar a encontrar dicha molécula.

[0052] De acuerdo con un aspecto preferido, la pequeña molécula química previene la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3. En un aspecto más preferido, la pequeña molécula química que previene la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 pertenece a la clase de pirido [2,3-d]pirimidina.

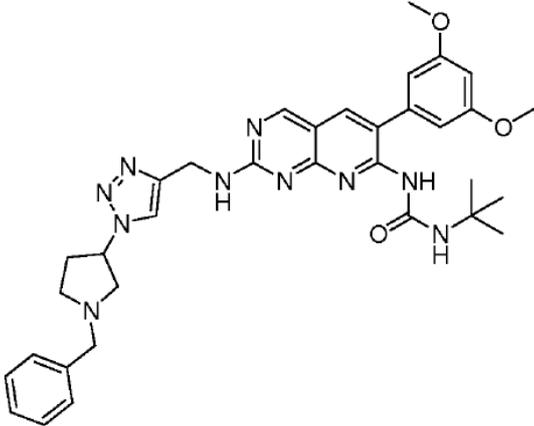
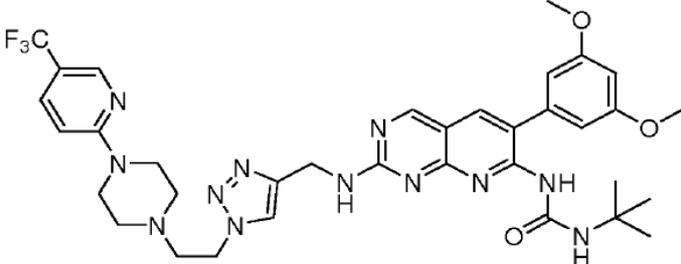
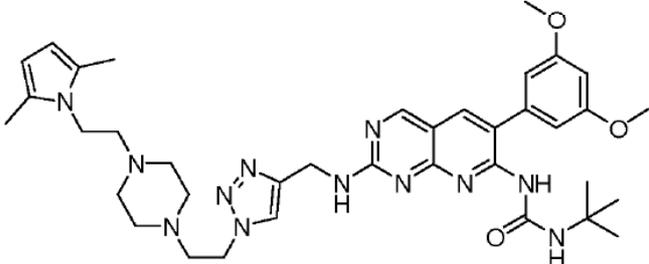
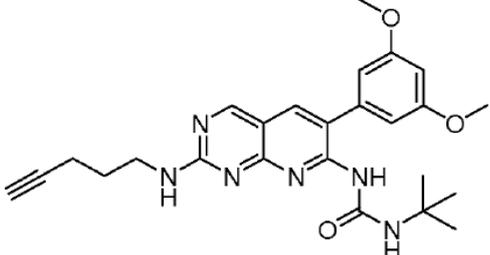
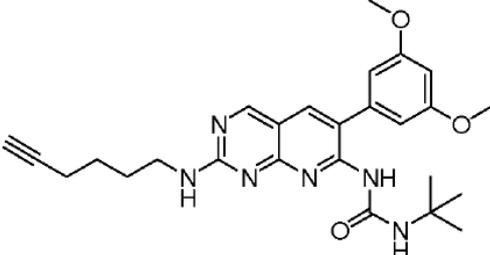
[0053] Más preferiblemente, la pequeña molécula química que impide la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos PD173074, 18, 19a a 19m, 22b, 22c, 23b a 23f descritos en la tabla a continuación (así como en la Figura 2a y el Esquema 3 del artículo por Le Corre et al, Org Biomol Chem., 8: 2164-2173, 2010).

Compuesto	Estructura
5 PD173074	
15 19a	
25 19b	
35 19c	
45 19d	
60 19e	

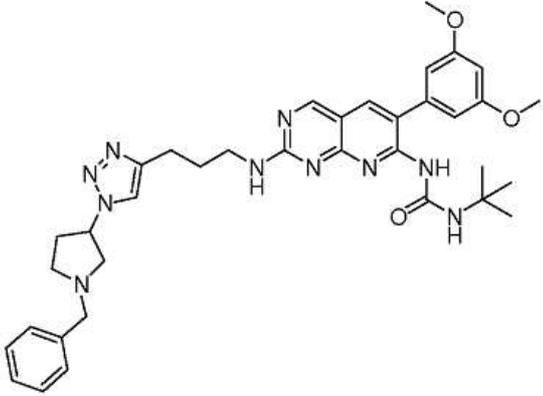
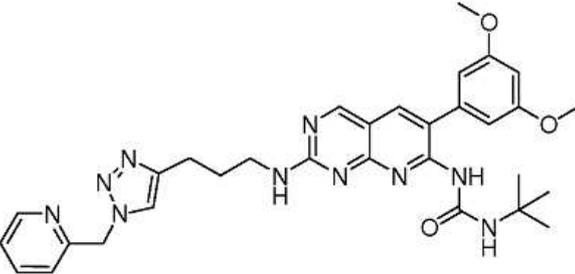
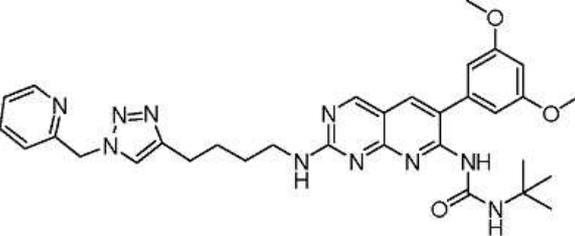
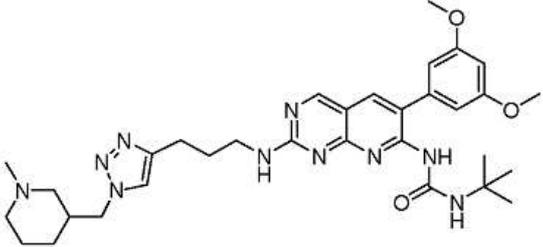
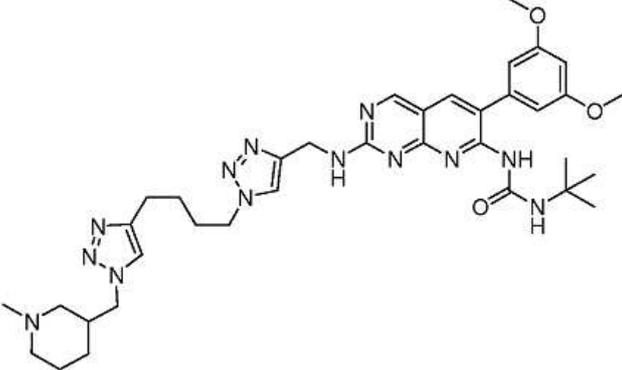
(continuación)

Compuesto	Estructura
5 10 15 19f	
20 25 19g	
30 35 40 19h	
45 50 19i	
55 60 65 19j	

(continuacion)

Compuesto	Estructura
5 10 15 20 19k	
25 30 19l	
35 40 19m	
45 50 22b	
55 60 65 22c	

(continuación)

Compuesto	Estructura
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p>	<p>23b</p> 
<p>20</p> <p>25</p> <p>30</p>	<p>23c</p> 
<p>35</p> <p>40</p>	<p>23d</p> 
<p>45</p> <p>50</p>	<p>23e</p> 
<p>55</p> <p>60</p> <p>65</p>	<p>23f</p> 

[0054] Ventajosamente, la pequeña molécula química que previene la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 es el compuesto PD173075 o el compuesto 19g, correspondiente al compuesto "A31" que se describe en la Figura 1A de la presente solicitud y en la Tabla A.

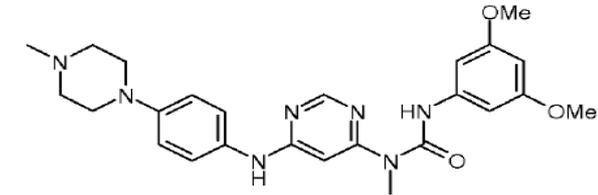
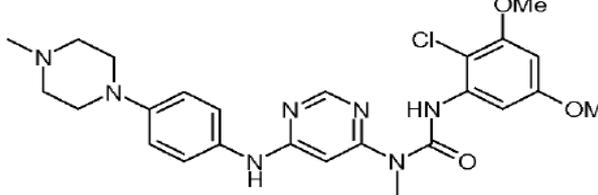
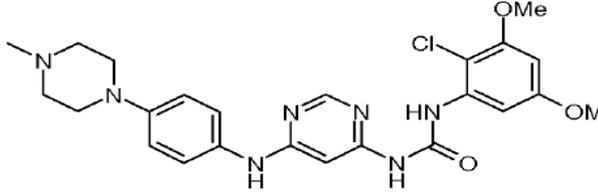
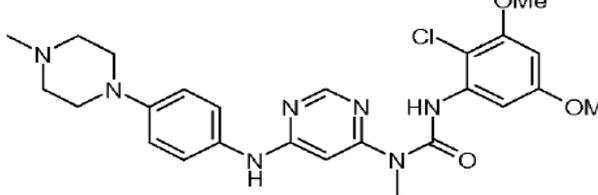
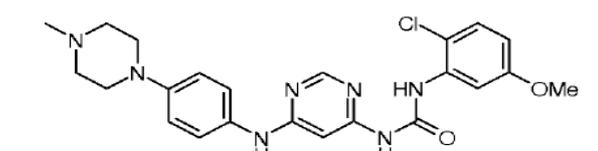
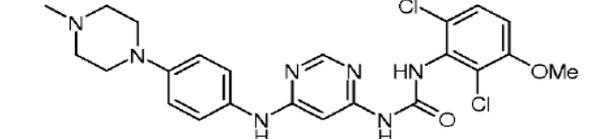
5 **[0055]** En otro aspecto más preferido, la pequeña molécula química que previene la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 pertenece a la clase N-aril-N'-pirimidin-4-il urea.

10 **[0056]** Más preferiblemente, la pequeña molécula química que impide la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 1a a 1n descritos en la Tabla B a continuación (así como en la Tabla 1 del artículo por Vito Guagnano et al, Journal of Medicinal Chemistry, 54: 7066-7083, 2011).

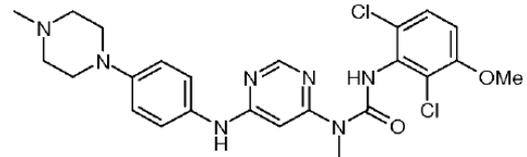
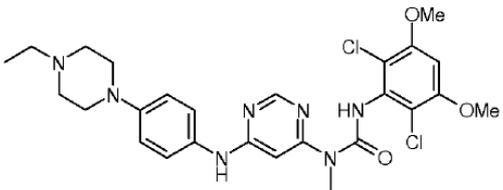
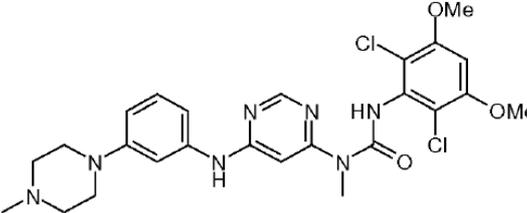
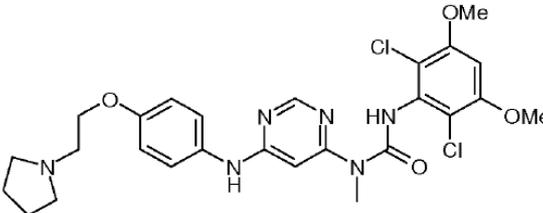
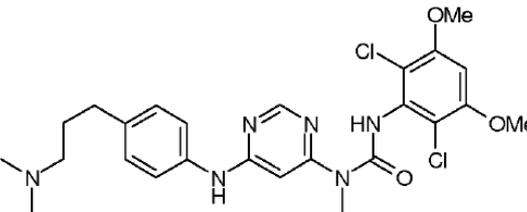
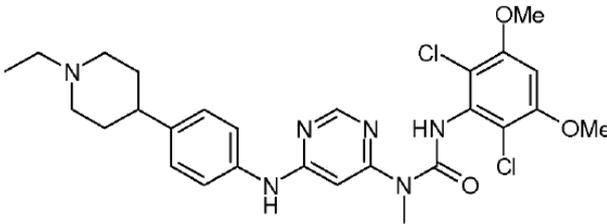
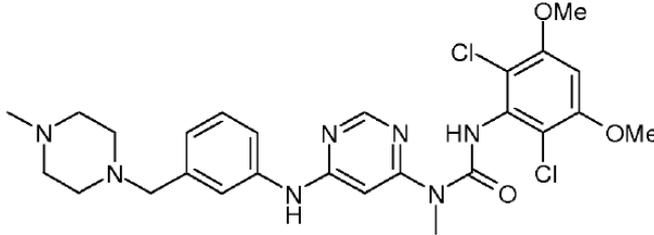
[0057] Ventajosamente, la pequeña molécula química que previene la unión de ATP al "sitio de unión a ATP" de FGFR3 es el compuesto 1h (también llamado BGJ-398), descrito en la Tabla B a continuación.

15

Tabla B

Compuesto	Estructura
20 25 1a	
30 35 1b	
40 45 1c	
50 55 1d	
60 65 1e	
1f	

(continuación)

Compuesto	Estructura
5 1g	
15 1h	
20 25 1i	
30 35 1j	
40 45 1k	
50 55 1l	
60 65 1m	

(continuación)

Compuesto	Estructura
1n	

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona. Los polipéptidos incluyen proteínas naturales, polipéptidos sintéticos o recombinantes y péptidos (es decir, polipéptidos de menos de 50 aminoácidos), así como polipéptidos híbridos, modificados posttraducciona. y peptidomiméticos.

[0059] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a los 20 alfa-aminoácidos estándar, así como derivados de origen natural y derivados sintéticos. Un polipéptido puede contener aminoácidos L o D o una combinación de los mismos.

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "peptidomimético" se refiere a estructuras similares a péptidos que tienen estructuras que no son aminoácidos sustituidos, pero que imitan la estructura química de un péptido.

[0061] El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no sólo las moléculas de anticuerpos completas, sino también fragmentos de anticuerpo, así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

[0062] En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede corresponder a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano), un fragmento de un anticuerpo policlonal o monoclonal o un diacuerpo.

[0063] "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', Fd, dAb, dsFv, scFv, sc(Fv)₂, CDRs, diacuerpos y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0064] Los anticuerpos según la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en el sector, tales como, sin limitación, cualquier sustancia química, biológica, genética o enzimática, ya sea solos o en combinación. Los anticuerpos de esta invención pueden obtenerse mediante la producción y el cultivo de hibridomas.

[0065] Según una realización preferida, el antagonista es un anticuerpo que reconoce específicamente y se une al receptor FGFR3 e impide la unión de ATP al sitio de unión a ATP de FGFR3.

[0066] En otro aspecto, el antagonista es un anticuerpo que impide la oligomerización funcional del receptor.

[0067] "Aptámeros" son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden ser aislados a través del enriquecimiento con Systematic Evolution of Ligands by EXponential (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. and Gold L., Science, 1990, 249 (4968): 505-10. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta

5 biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, opcionalmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena SD, Clin. Chem., 1999, 45 (9): 1628-1650. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida mostrada por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de E. coli, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias mediante dos procedimientos híbridos (Colas et al., Nature, 1996,380, 548-50).

10 **[0068]** Con el fin de orientar el antagonista de la invención específicamente a condrocitos de la placa de crecimiento, el antagonista puede etiquetarse con moléculas que poseen afinidad para el cartílago o condrocitos. Tales moléculas se describen por ejemplo por Rothenfluh et al. (Nat Mater 7: 248-254, 2008), y Laroui H et al. (Biomacromolecules, 8: 1041-1021, 2007).

15 **[0069]** El antagonista de la descripción se puede utilizar en combinación con hormonas de crecimiento y/o sustancias activadoras de guanilil ciclasa B (tales como las sustancias descritas en la solicitud US 2003/0068313).

[0070] Los antagonistas comprendidos en combinación están destinados a ser administrados simultánea o secuencialmente.

20 **[0071]** De este modo, la presente invención también se refiere a una combinación de al menos un antagonista de la invención y al menos otro agente, tal como hormonas de crecimiento y/o sustancias activadoras de guanilil ciclasa B, para uso secuencial o simultáneo en el tratamiento o la prevención de una displasia esquelética relacionada con FGFR3.

25 **[0072]** El antagonista o combinación utilizados en el procedimiento o uso indicados anteriormente se proporcionan en un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable que no es perjudicial para el paciente a tratar.

30 **[0073]** Los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones de esta invención incluyen, pero no están limitados a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS), tales como d-a-tocoferol polietilenglicol 1000 succinato, tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéuticas, tal como Tweens u otras matrices de suministro polimérico similares, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógenofosfato disódico, hidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxiopileno, polietilenglicol y grasa de lana.

40 **[0074]** Como se entiende por los expertos, las composiciones se formulan adecuadamente para que sean compatibles con la vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración adecuadas incluyen la vía parenteral, incluyendo, por ejemplo intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o inyecciones intratumorales locales. La vía oral también puede ser utilizada, siempre que la composición esté en una forma adecuada para administración oral, capaz de proteger el principio activo de las enzimas gástricas e intestinales.

45 **[0075]** Además, la cantidad de antagonista o su combinación utilizada en el procedimiento o uso indicado anteriormente es una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de antagonista es la cantidad suficiente para lograr el crecimiento de huesos o cartílagos, o para tratar una enfermedad deseada sin causar efectos excesivamente negativos en el sujeto al que se administra el antagonista o la combinación. La cantidad exacta de antagonista que debe utilizarse y la composición que va a administrarse variará según la edad y el peso del paciente a tratar, el tipo de enfermedad, el modo de administración, la frecuencia de administración, así como otros ingredientes en la composición que comprende el antagonista. En general, el antagonista para uso en el tratamiento o prevención de displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 se puede administrar en el intervalo de aproximadamente 100 µg/kg a 1 mg/kg, de forma alternativa de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg/kg, de forma alternativa de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg/Kg. Las dosis eficaces también variarán dependiendo de la vía de administración, así como la posibilidad de utilización simultánea con otros agentes.

60 **[0076]** Cuando el antagonista pertenece a la clase de pirido [2,3-d]pirimidina, se administra preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/Kg. Típicamente, el antagonista PD173074 se administra de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/Kg, preferiblemente de 2 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, más preferiblemente de 4 mg/kg a aproximadamente 6 mg/Kg. Cuando el antagonista pertenece a la clase de N-aril-N'-pirimidin-4-il urea, se administra preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Típicamente, el antagonista BGJ-398 se administra de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/Kg, preferiblemente de 2 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, más preferiblemente de 4 mg/kg a aproximadamente 6 mg/Kg. Ventajosamente, BGJ-398 se administra a 1,66 mg/kg.

65

[0077] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero humano o no humano, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, más preferiblemente un niño (es decir, un niño que está creciendo). Preferiblemente, cuando el sujeto a tratar es un niño, el antagonista se administra durante todo o parte del periodo de crecimiento de los niños.

[0078] En el contexto de la invención, el término "tratamiento" se usa en el presente documento para caracterizar un procedimiento o proceso terapéutico que está dirigido a (1) la ralentización o detención de la progresión, empeoramiento o deterioro de los síntomas del estado de enfermedad o afección al que se aplica dicho término; (2) aliviar o lograr mejoras de los síntomas del estado de enfermedad o afección al que se aplica dicho término; y/o (3) revertir o curar el estado de enfermedad o afección al que se aplica dicho término.

[0079] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" pretende caracterizar un procedimiento o proceso profiláctico que está dirigido a retrasar o prevenir la aparición de un trastorno o afección al que se aplica dicho término.

[0080] A lo largo de la presente solicitud, las referencias a entradas de bases de datos públicas se refieren a las entradas en vigor el 23 de noviembre de 2011. Además, en toda esta solicitud, se citan diversas referencias.

[0081] La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante la descripción adicional indicada a continuación, que se refiere a ejemplos que muestran que la administración de inhibidores de tirosina quinasa, en particular un compuesto que pertenecen a la clase de pirido [2,3-d]pirimidina clase o a la clase de N-aril-N'-pirimidin-4-il urea, restaura el crecimiento óseo en modelos ex vivo e in vivo. Debe entenderse sin embargo que la invención se define por las reivindicaciones, y que estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ninguna manera una limitación de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0082]

Figura 1. A31 impide la actividad quinasa de FGFR3.

(A) Esquema molecular del compuesto A31. (B) Estructura general que muestra la conformación de acoplamiento de A31 en el interior del bolsillo de unión de FGFR3. A31 se representa con barras. (C) Estructura general que muestra A31 en el sitio de unión a ATP.

Figura 2. A31 inhibe la activación constitutiva de FGFR3.

Las inmunotransferencias que muestran la sobreexpresión de FGFR3 en células transfectadas (HEK) con ADNc humano WT (FGFR3^{+/+}) y 3 construcciones de ADNc mutantes humanos (FGFR3^{Y373C}, FGFR3^{K650E}, FGFR3^{K650M}). FGFR3 se inmunoprecipita (IP) y se inmunotransfiere (IB) con anticuerpos anti-FGFR3 y anticuerpos antifosfotirosina (pTyr). La inmunotransferencia pTyr que muestra la fosforilación constitutiva de FGFR3 en células transfectadas con construcciones de ADNc mutantes. Las inmunotransferencias de FGFR3 que muestran tres isoformas de la proteína (105, 115 y 130 kDa) en WT (FGFR3^{+/+}) y un mutante (FGFR3^{Y373C/+}). Dos isoformas de la proteína FGFR3 (105 kDa y 115 kDa) estaban presentes en células transfectadas con construcciones mutantes (FGFR3^{K650M} y FGFR3^{K650E}). A31 reduce la fosforilación constitutiva de FGFR3.

Figura 3. A31 restaura el crecimiento longitudinal del hueso de fémures Fgfr3^{Y367C/+}.

(A) Embriones de ratones Fgfr3^{Y367C/+} en E16.5 muestra un cráneo en forma de huevo. (B) El fémur de Fgfr3^{Y367C/+} es más amplio con una diáfisis más corta en E16.5. (C) La tinción con rojo de alizarina y azul alcian muestran el pequeño tamaño de fémures FGFR3^{Y367C/+}. A31 aumenta el tamaño de los fémures Fgfr3^{Y367C/+} después de 5 días de cultivo. (D) Las mediciones de la longitud de hueso muestran un crecimiento longitudinal reducido en fémures Fgfr3^{Y367C/+} en comparación con WT (Fgfr3^{Y367C/+}, 461 ± 119 µm; WT, 1247 ± 227 µm; p <10⁻¹⁰). A31 aumenta el crecimiento longitudinal en fémures Fgfr3^{Y367C/+}, el crecimiento del hueso es mayor en fémures Fgfr3^{Y367C/+} en comparación con los controles (Fgfr3^{Y367C/+}, 1880 ± 558 µm; WT, 1863 ± 255 µm; ***p <10⁻¹⁹ frente a controles no tratados). Los experimentos se realizaron 6 veces y se muestra la longitud del hueso como la media +/- s.d.

Figura 4. A31 modifica el tamaño de la placa de crecimiento y la morfología de condrocitos.

(A) Tinción HES que muestra el tamaño reducido de la placa de crecimiento de Fgfr3^{Y367C/+}. A31 induce un aumento en el tamaño de la placa de crecimiento de los ratones FGFR3^{+/+}. (B) Hibridación in situ de colágeno de tipo X que muestra una zona hipertrófica marcadamente reducida (ver el tamaño de "H" simbolizado por el tamaño de las flechas de doble punta) de placas de crecimiento de Fgfr3^{Y367C/+} en comparación con WT. A31 induce una mayor expresión de colágeno de tipo X en placas de crecimiento de Fgfr3^{Y367C/+}.

Figura 5. A31 disminuye la sobreexpresión de Fgfr3 en fémures Fgfr3^{Y367C/+}. Se examinaron condrocitos

primarios costales por transferencia Western con anti-FGFR3. El nivel de proteína Fgfr3 es mayor en condrocitos *Fgfr3^{Y367C/+}* en comparación con WT. A31 redujo esta sobreexpresión.

Figura 6. A31 reduce la proliferación y la expresión de reguladores del ciclo celular en placas de crecimiento.

(A) Cuantificación de células positivas en PCNA positivas en zonas proliferativa (P), prehipertrófica (PH) e hipertrófica (H) que muestran un mayor nivel de células positivas en PCNA en placas de crecimiento de *Fgfr3^{Y367C/+}* (73% (PH) y 43 % (H), **p <0,005 frente a WT) en comparación con WT (31% (PH) y 18% (H)). A31 induce una fuerte disminución de la expresión de PCNA en zonas de PH y H de placas de crecimiento de *Fgfr3^{Y367C/+}* (20% (pH) y 18% (H), ***p <10⁻⁴ frente fémures sin tratar). Los experimentos se realizaron seis veces y tres observadores contaron las células positivas. % de células positivas en PCNA se muestran como media +/- s.d. (B) Inmunotransferencia que muestra una expresión de ciclina D1 mayor en condrocitos *Fgfr3^{Y367C/+}* primarios costales en comparación con WT. A31 reduce la expresión de ciclina D1 en condrocitos *Fgfr3^{Y367C/+}*. La actina se incluye como control de carga.

Figura 7. PD173074 restaura el crecimiento longitudinal del hueso de fémures *Fgfr3^{Y367C/+}*.

(A) La tinción con rojo alizarina y azul alcian muestra que después de 5 días de cultivo con PD173074 aumenta el tamaño de los fémures *Fgfr3^{Y367C/+}* (panel izquierdo). El efecto de PD173074 en el crecimiento de fémur es similar al de A31 (panel derecho).

(B) PD173074 aumenta el crecimiento longitudinal en fémures *Fgfr3^{Y367C/+}* (véase la barra "PD173074" frente a barra "sin tratamiento"), y el crecimiento de los huesos de fémures tratados con PD173074 es análogo al observado cuando los fémures *FGFR3^{Y367C/+}* son tratados con A31.

Figura 8. PD173074 atenúa el fenotipo de enanismo de ratones *Fgfr3^{Y367C/+}*. Ratones *Fgfr3^{Y367C/+}* de siete días de vida recibieron una administración subcutánea de 4,00 mg de PD173074/kg durante 10 días. El efecto del tratamiento en el esqueleto y el crecimiento del cuerpo se evaluó mediante un análisis de rayos X. En los paneles (A) y (B), el ratón *Fgfr3^{Y367C/+}* tratado con PD173074 está a la izquierda, ratón *Fgfr3^{Y367C/+}* tratado con vehículo está a la derecha).

Figura 9. BGJ-398 restaura el crecimiento longitudinal del hueso de fémures *Fgfr3^{Y367C/+}*.

Las mediciones de longitud de hueso que muestran un crecimiento longitudinal reducido en fémures *Fgfr3^{Y367C/+}* en comparación con WT (*Fgfr3^{+/+}*). La concentración de BGJ-398 que va de 100 nM a 1 μM aumenta el crecimiento longitudinal de fémures *Fgfr3^{Y367C/+}*: el crecimiento del hueso es mayor en fémures *Fgfr3^{Y367C/+}* en comparación con los controles (*Fgfr3^{+/+}*).

Figura 10. BGJ-398 modifica el tamaño de la placa de crecimiento y la morfología de condrocitos.

(A) Tinción HES que muestra el tamaño reducido de la placa de crecimiento de *Fgfr3^{Y367C/+}*. BGJ-398 induce un aumento en el tamaño de la placa de crecimiento de los ratones *Fgfr3^{Y367C/+}*. (B) Hibridación in situ de colágeno de tipo X que muestra una zona hipertrófica marcadamente reducida (simbolizado por el tamaño de las flechas de doble punta) de placas de crecimiento de *Fgfr3^{Y367C/+}* en comparación con WT (*Fgfr3^{+/+}*). BGJ-398 induce una mayor expresión de colágeno de tipo X en placas de crecimiento de *Fgfr3^{Y367C/+}*.

Figura 11. BGJ-398 atenúa el fenotipo de enanismo de ratones *Fgfr3^{Y367C/+}*. Ratones *Fgfr3^{Y367C/+}* de siete días de vida recibieron una administración subcutánea de 1,66 mg/kg de BGJ-398 durante 10 días. El efecto del tratamiento en el esqueleto y el crecimiento del cuerpo se evaluó mediante un análisis de rayos X (ratón *Fgfr3^{Y367C/+}* tratado con BGJ-398 está a la izquierda, ratón *Fgfr3^{Y367C/+}* tratado con vehículo está a la derecha).

EJEMPLO 1: Materiales y Procedimientos

Compuesto químico.

[0083] Se diseñó previamente una serie de inhibidores y se sintetizaron como análogos de PD173074 (Miyake et al, J Pharmacol Exp Rher, 332: 797-802, 2010) que tenían diversos N-sustituyentes. De los 27 análogos sintetizados, A31 (se refiere a 19g) se seleccionó en el transcurso de ensayos celulares preliminares por su capacidad para inhibir la fosforilación de FGFR3 (Le Corre et al, Org Biomol Chem., 8: 2164-2173, 2010.). Este compuesto compite con la unión de ATP y puede inhibir la autofosforilación de FGFR3, con un valor de IC50 de aproximadamente 190 nm. Como control, los inventores utilizaron el TKI FGFR comercial, PD173074. Los TKI se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM. La solución madre se almacenó a -20°C antes de su uso.

Análisis computacional.

[0084] La estructura de dominio quinasa de FGFR3 fue predicha por modelado por homología con el software Esyspred3D (Lambert et al, Bioinformatics, 18: 1250-1256, 2002), utilizando una estructura reciente de rayos X de la proteína FGFR1 altamente homóloga (código pdb 3JS2) (Ravindranathan et al, J Med Chem., 53: 1662-1672, 2010). Los inventores utilizaron el software AMBER (Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Merz, K.M., Pearlman, D.A., Crowley, M. et al. (2006) Universidad de California, San Francisco) de acuerdo con un protocolo publicado previamente (Luo, Y. et al, J Mol Model., 14: 901-910, 2008). Los inventores construyeron un compuesto A31 utilizando la versión 11.0 de paquete de software Sybyl (Sybyl, Tripos Inc., 1699 Sur Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144 USA). Se consideraron dos estados del carbono asimétrico (R, S) y dos estados de protonación diferentes del resto amino vecino (neutro y +1). Se obtuvieron cuatro estructuras químicas distintas. Se realizaron minimizaciones de energía de estas cuatro estructuras de A31 (Hu, R., Barbault, F., Delamar, M. y Zhang, R., Bioorg Med Chem, 17: 2400-2409, 2009). Los cálculos de acoplamiento se llevaron a cabo con la versión 4.2 del programa AutoDock (Morris et al, J Comput Chem., 19: 1639-1662, 1998.). Se calcularon las cargas atómicas unidas de Kollman. Se construyó una celda de malla de 23x20x33 Å en los ejes x, y y z, respectivamente, alrededor de la cavidad de unión. A todos los ángulos de torsión de ligando se les permitió girar durante el acoplamiento, lo que conduce a una flexibilidad completa. Se realizaron cien ciclos de cálculos de Algoritmo Genético Lamarckiano para completar la búsqueda conformacional. Se agruparon 100 estructuras de acoplamiento en familias de conformación de acuerdo con una RMSD menor que 2,0 Å. Los inventores seleccionaron la conformación que presentaba la energía libre de acoplamiento más baja de la unión en el grupo más poblada.

Experimentos ex vivo.

[0085] Se utilizaron ratones Fgfr3^{Y367C/+} heterocigotos que expresan de forma ubicua la mutación Y367C y que presentan una enanismo grave (Pannier et al, Biochim Biophys Acta, 1792: 140-147, 2009). Se llevaron a cabo seis grupos de experimentos ex vivo. Se utilizaron embriones con fémur en día E16.5 de ratones WT (n = 6) y Fgfr3^{Y367C/+} (n = 6) y se incubaron durante 5 días en medio DMEM con antibióticos y 0,2% de BSA (Sigma) suplementado con A31 o PD173074 (como control) a una concentración de 2 mM. El fémur derecho se cultivó en medio suplementado y se comparó con el izquierdo cultivado en medio de control. La caja torácica de embriones de ratones E16.5 WT y Fgfr3^{Y367C/+} se aisló y se despojó de todos los tejidos blandos. Se obtuvieron condrocitos primarios de cajas torácicas. Las costillas se incubaron en una solución de pronasa (Roche; 2 mg/ml) seguido de una digestión en colagenasa A (Roche; 3 mg/ml) a 37°C. Los condrocitos aislados se sembraron a una densidad de 2.105 células en placas de 6 pocillos que contenían DMEM suplementado con 10% de FCS y antibióticos, y se les permitió alcanzar la subconfluencia. Los cultivos se suplementaron con A31 o PD173074 (como control) a una concentración de 2 mM. Las células fueron tratadas con A31 PD173074 (2 mM) (como control) en DMEM libre de suero suplementado con 0,2% de BSA y se recogieron después de 24 horas. Para establecer el efecto de los inhibidores, el fémur derecho se cultivó en medio suplementado y se comparó con el izquierdo cultivado en medio de control. La longitud del hueso se midió al principio (antes del tratamiento) y al final del transcurso del tiempo. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. El genotipo de ratones WT, Fgfr3^{Y367C/+} y Fgfr3^{-/-} se determinó por PCR de ADN de la cola como se ha descrito previamente (Pannier et al, Biochim Biophys Acta, 1792: 140-147, 2009). Todos los procedimientos y protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales.

Análisis histológico, hibridación *in situ* e inmunohistoquímico

[0086] Se fijaron explantes de extremidades después del cultivo en 4% de paraformaldehído a 4°C, y se colocaron en una solución de tinción durante 45-60 minutos (0,05% rojo de alizarina, 0,015% Azul Alcían, ácido acético al 5% en etanol al 70%) o se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones de 5 en serie con hematoxilina-eosina utilizando protocolos estándar para el análisis histológico o se sometieron a hibridación *in situ* o tinción inmunohistoquímica.

[0087] Se llevó a cabo una hibridación *in situ* utilizando ribosondas antisentido marcadas con [S35]-UTP para colágeno X tal como se describió previamente (Delezoide et al., Hum Mol Genet, 6, 1899-1906, 1997). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Para la inmunohistoquímica, las secciones se tiñeron con anticuerpos específicos para FGFR3 (dilución 1:250; Sigma), anti PCNA (dilución 1:1000; Abcam), anti-K167 (1:300; Abcam), anti-ciclina D1 (dilución 1:80; Santa Cruz) y anti-p57 (dilución 1:100; Santa Cruz) utilizando el kit Dako Envision. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Olympus PD70-IX2-UCB.

Cuantificación de la expresión de PCNA.

[0088] Tres observadores contaron los condrocitos positivos y negativos de PCNA en zonas proliferativa (H), prehipertrófica (PH) e hipertrófica (H) de la placa de crecimiento. Se utilizó la prueba t de Student para comparar los fémures tratados (A31) y sin tratar. Se utilizó software Imagine cellsens (Olympus) para el recuento de células. Un valor de p <0,05 se considera significativo.

Experimentos de inmunoprecipitación, inmunotransferencia e inmunocitoquímica.

[0089] Se transfectaron de forma transitoria células de riñón embrionario humanas (HEK) y líneas de condrocitos humanos (Benoist-Lasselin et al, FEBS Lett, 581: 2593-2598, 2007) con constructos humanos de FGFR3 (FGFR^{3Y373C}, FGFR3^{K650M}, FGFR3^{K650E}) (Gibbs, L. y Legeai-Mallet, L. Biochim Biophys Acta, 1773: 502-512, 2007), utilizando Fugene 6 (Roche). A31 (31) o PD173074 (Parke Davies) se añadieron a una concentración de 2 mM durante la noche. Las células transfectadas se lisaron en tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,6, NaCl 150 mM, NP40 al 0,5%, desoxicolato de sodio al 0,25%, suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa).

[0090] La inmunoprecipitación se realizó mediante la incubación de 3 ml de anti-FGFR3 de conejo (Sigma)/500 mg de proteína con proteína A-agarosa (Roche). Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en geles de bis-tris acrilamida al 4-12% NuPAGE (Invitrogen). Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en geles de bis-tris acrilamida al 4-12% NuPAGE (Invitrogen). Las transferencias se hibridaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-FGFR3 (dilución 1:1000; Sigma), o anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (dilución 1:400; Cell Signaling). Los lisados de condrocitos murinos primarios (E16.5) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se hibridaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-ciclina D1 (dilución 1: 100; Santa Cruz). Se utilizó un anticuerpo secundario, anti-conejo o anti-ratón, acoplado a peroxidasa, a una dilución de 1:10.000 (Amersham). Las proteínas unidas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Las transferencias se rehibridaron con un anticuerpo antipan-actina para la cuantificación (Millipore).

[0091] Para la inmunocitoquímica, los inventores utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpos anti-FGFR3 (dilución 1:400; Sigma) y anticuerpos anti-fosfotirosina (dilución 1:200; señalización celular) y anticuerpos secundarios anticonejo de cabra Alexa Fluor®488 y anti-ratón de cabra Alexa Fluor®568 (dilución 1:400; Molecular Probes). Las células se cubrieron con Faramount Aquaeous Mounting Medium (Dako) y se analizaron usando un microscopio Olympus PD70-IX2-UCB.

Estudios de proliferación.

[0092] Se utilizaron clones NIH-3T3 que expresaban de forma estable FGFR3^{+/+} (WT) y FGFR3^{Y373C}, FGFR3K650M (construcciones humanas). Los clones estables se seleccionaron con G418. Los clones NIH-3T3 se incubaron durante 8 h en 10% de DMEM de suero de ternero recién nacido suplementado o no con A31 (2 mM). Se añadió [3H] timidina a una concentración de 10 mCi/ml y se incubó durante 16 horas. Las células se recogieron sobre papel de filtro de fibra de vidrio y se ensayaron para determinar la radiactividad por recuento de centelleo líquido. Los inventores utilizaron un contador de centelleo Top Count Microplates (Perkin Elmer).

Experimentos in vivo.

[0093] La eficacia de PD173074 y BGJ-398 en la atenuación del fenotipo de enanismo de ratones Fgfr3^{Y367C/+} se evaluó in vivo. Los ratones tenían siete días de vida al inicio del tratamiento y recibieron una administración subcutánea diaria de 4,00 mg/kg de PD173074 o de 1,66 mg/kg de BGJ-398 durante 10 días.

EJEMPLO 2: Fuerte interacción entre el dominio de tirosina quinasa de FGFR3 y A31.

[0094] Se utilizaron análisis computacionales para estimar las interacciones entre FGFR3 y A31, un compuesto sintético de la clase de pirido [2,3-d]pirimidina, como un nuevo inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) FGFR3 (Figura 1A). Hasta la fecha, los intentos para determinar la estructura de rayos X experimental del dominio quinasa de FGFR3 han fracasado. Para superar este inconveniente, los inventores predijeron que la estructura de FGFR3 in silico mediante el uso de una nueva estructura cristalina del FGFR1 altamente homólogo (Ravindranathan et al, J Med Chem., 53: 1662-1672, 2010). La estructura 3D resultante de FGFR3 mostró una baja energía global y componentes electrostáticos y de Van der Waals negativos, lo que indica un alto nivel de confianza para esta predicción. Los cálculos de acoplamiento se utilizaron para encontrar la posición óptima de la A31 en el bolsillo de unión del FGFR3. Las interacciones entre el dominio quinasa de FGFR3 y A31 se representan en la Figura 1B. El grupo aromático que lleva los dos restos metoxi y el anillo bifenilo inducen fuertes interacciones entre el dominio quinasa de FGFR3 y A31. Dos enlaces de hidrógeno localizan el anillo bifenilo en la posición de adenina de ATP, llenando el sitio activo de FGFR3 y, de esta manera, A31 compite directamente con el sustrato. La cola de amina cíclica de A31 está profundamente situada dentro de la cavidad de FGFR3 en la proximidad de un puente salino de proteína. En consecuencia, el puente salino se rompe, impidiendo así la actividad quinasa de FGFR3. Estos datos in-silico sugieren que A31 inhibe específicamente la actividad quinasa de FGFR3.

EJEMPLO 3: A31 inhibe la fosforilación y la proliferación de FGFR3 de líneas de células Fgfr3 mutantes.

[0095] Los inventores evaluaron la capacidad de A31 para inhibir la fosforilación constitutiva de FGFR3 en líneas de condrocitos humanos (Gibbs, L. y Legeai-Mallet, L. Biochim Biophys Acta, 1773: 502-512, 2007) que expresan de forma transitoria formas activadas de FGFR3 (FGFR3^{Y373C} o FGFR3^{K650E} (TD), FGFR3^{K650M} (SADDAN) o FGFR3^{+/+}).

[0096] La inmunoprecipitación y transferencia de tipo Western mostraron la presencia de una isoforma madura de 130 kDa en los lisados celulares de WT y FGFR3^{Y373C}, mientras que sólo una forma inmadura de 115 kDa estaba

presente en los lisados de FGFR3^{K650M} y FGFR3^{K650E} (Figura 2). A31 abolió la fosforilación del receptor en todas las células que expresaban mutaciones de FGFR3 (Figura 2). Se encontraron resultados similares con un inhibidor TKI comercial (PD173074) (Figura 2). Esta inhibición se confirmó mediante inmunocitoquímica en células transfectadas que expresaban mutaciones de FGFR3 (datos no mostrados). Los inventores observaron una inhibición completa de la fosforilación de FGFR3 por A31.

[0097] Estos datos confirmaron la capacidad de A31 de inhibir la fosforilación de FGFR3 constitutiva en células transfectadas. Para determinar si A31 modula la actividad mitogénica de FGFR3 activado, los inventores midieron la incorporación de [3H]-timidina en células NIH3T3 transfectadas con FGFR3^{Y373C} y FGFR3^{K650M}. La actividad mitogénica se aumentó en células que expresaban mutaciones de FGFR3 en comparación con WT (FGFR3^{Y373C}, 9927 ± 2921 cpm; FGFR3^{K650M}, 15048 ± 5251 cpm; WT, 7499 ± 1667 cpm; p <10⁻⁵ frente a WT).

[0098] El tratamiento con A31 redujo fuertemente la síntesis de ADN de todas las líneas celulares mutantes (FGFR3^{Y373C}, 3144 ± 1201 cpm; FGFR3^{K650M}, 6281 ± 2699 cpm; p <10⁻¹¹, p <10⁻²⁰ frente a DMSO). Estos resultados demuestran que A31 disminuye la actividad mitogénica de los mutantes de FGFR3.

[0099] Para confirmar estos resultados, también se analizó la capacidad de BGJ-398 (también designado como compuesto 1h en la Tabla B), otro inhibidor de la tirosina quinasa, de inhibir la fosforilación constitutiva de FGFR3 en células (HEK-293) que expresan transitoriamente formas activadas de FGFR3 (es decir FGFR3^{Y373C}, FGFR3^{K650E}, FGFR3^{K650M}, FGFR3^{G380R}). Se encontró que 10 µM de BGJ-398 suprimió la fosforilación del receptor en todas las células que expresan mutaciones de FGFR3 (datos no mostrados).

EJEMPLO 4: Rescate del defecto de crecimiento del fémur Fgfr3^{Y367C/+} por A31 y BGJ-398.

[0100] Se analizó A31 en la ganancia de función en un modelo de ratón Fgfr3^{Y367C/+} (Pannier et al, Biochim Biophys Acta, 1792: 140-147, 2009). Cabe indicar que la mutación Y367C en FGFR3 de ratón corresponde a la mutación Y373C en FGFR3 humano.

[0101] Los ratones Fgfr3^{Y367C/+} muestran una longitud reducida de los huesos largos, fémures amplios, un tronco estrecho, costillas cortas y un cráneo ligeramente en forma de huevo, que se asemeja estrechamente a la acondroplasia (Figuras 3A y B). Los inventores analizaron los efectos de A31 en la osificación endocondral en ratones Fgfr3^{Y367C/+} mediante el uso de un sistema de cultivo ex vivo de cultivo para explantes de extremidades embrionarias en el día 16.5 (E16.5). Los fémures mutantes cultivados sin A31 tuvieron un crecimiento longitudinal significativamente reducido en comparación con WT (Fgfr3^{Y367C/+}, 461 ± 119 µm; WT, 1247 ± 226 µm; p <10⁻¹⁰) (Figuras 3C y D). A31 fue capaz de inducir y restaurar completamente el crecimiento de las extremidades en fémures Fgfr3^{Y367C/+} (Fgfr3^{Y367C/+}, ganancia de 1880 ± 558 µm, WT, 1863 ± 255 µm; p <10⁻¹⁹) (Figuras 3C y D). Después de 5 días de cultivo, el aumento de la longitud de los fémures mutantes tratados fue 2,6 veces más que el de WT.

[0102] Los exámenes histológicos utilizando tinción HES (Figura 4A) y el etiquetado de colágeno de tipo X (Figura 4B), revelaron una reducción en el tamaño de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento de ratón Fgfr3^{Y367C/+} (Figura 4B), con condrocitos anormalmente pequeños que se asemejan a células prehipertróficas en lugar de células hipertróficas. Los inventores evaluaron el impacto de A31 en la placa de crecimiento (Figura 4A). Curiosamente, A31 indujo una marcada expansión de la zona hipertrófica, con modificaciones marcadas de la forma de células proliferativas e hipertróficas. Los condrocitos tratados con A31 aparecieron ampliados y más esféricos, lo que se asemeja a condrocitos hipertróficos (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados sugieren que A31 aumentó el tamaño de las placas de crecimiento de mutantes mediante la restauración del proceso de maduración interrumpido de condrocitos.

[0103] Para confirmar los resultados obtenidos con el inhibidor de tirosina quinasa "A31", también se analizó otro FGFR3 perteneciente a la clase de pirido [2,3-d]pirimidina, es decir, el inhibidor de tirosina quinasa "PD173074".

[0104] Por lo tanto, se coincubaron explantes de fémur de embriones con 150 nM de PD173074 durante 5 días.

[0105] Como se ilustra por la ganancia en la longitud del fémur, PD173074 durante 5 días es suficiente para corregir la diferencia de longitud y normalizó el tamaño de la epífisis; PD173074 aumenta el crecimiento longitudinal en fémures Fgfr3^{Y367C/+} (ganancia del 77%; véanse las figuras 7 (A) y (B)); los fémures mutantes cultivados sin PD173074 tuvo un crecimiento longitudinal reducido en comparación con fémures WT (Fgfr3^{+/+}). El efecto de PD173074 en el crecimiento del fémur es similar al de A31 (véanse las figuras 7(A) y (B)).

[0106] Se realizaron experimentos similares con un antagonista que pertenece a la clase de N-aril-N'-pirimidin-4-il urea, es decir, el inhibidor de tirosina quinasa "BGJ-398".

[0107] Se coincubaron explantes de fémur de embriones con 100 nM (10⁻⁷ M) o 1 µM (10⁻⁶ M) de BGJ-398 durante 6 días.

[0108] Se observó un aumento dependiente de la concentración en el tamaño del fémur para concentraciones de BGJ-398 que variaban de 100 nM a 1 μ M, tal como se ilustra por la ganancia en la longitud del fémur. 100 nM de BGJ-398 durante 6 días es suficiente para corregir la diferencia de longitud y normalizó el tamaño de la epífisis. Se observa una ganancia de 71,86% en fémures Fgfr3^{Y367C/+} tratados (figura 9; fémures mutantes cultivados sin BGJ-398 tenían un crecimiento longitudinal reducido en comparación con fémures WT (Fgfr3^{+/+}).

[0109] También se llevaron a cabo exámenes histológicos utilizando tinción HES (figura 10A) y etiquetado de colágeno de tipo X (figura 10B).

[0110] La tinción HES de ratones WT (Fgfr3^{+/+}) y Fgfr3^{Y367C/+} mostró que la placa de crecimiento de ratones Fgfr3^{Y367C/+} tienen condrocitos mutantes más pequeños, mientras que las células son más grandes y más esféricas cuando los fémures se cultivan en presencia de 10⁻⁶ M de BGJ-398 (Figura 10A).

[0111] La figura 10B muestra que BGJ-398 induce una mayor expresión de colágeno de tipo X en la placa de crecimiento Fgfr3^{Y367C/+} y que aumenta el tamaño de la zona hipertrófica de los explantes del fémur de ratones Fgfr3^{Y367C/+}.

[0112] En conjunto, estos resultados mostraron cambios histológicos (mayor proliferación y diferenciación de condrocitos) cuando fémures de ratones Fgfr3^{Y367C/+} se cultivan en presencia de BGJ-398.

EJEMPLO 5: Efecto de A31 sobre la expresión de proteína Fgfr3.

[0113] Los presentes inventores evaluaron el nivel de expresión de la proteína Fgfr3 por tinción inmunohistoquímica y encontraron una sobreexpresión de Fgfr3 en placas de crecimiento Fgfr3^{Y367C/+}. A31 indujo una gran disminución de la expresión de Fgfr3 en fémures mutantes (datos no mostrados). Estos resultados fueron confirmados por transferencia Western en condrocitos primarios aislados de costillas E16.5 (Figura 5). Se reveló un mayor nivel de Fgfr3 en condrocitos Fgfr3^{Y367C/+} no tratados, mientras que este nivel era similar a WT después de la adición de A31. Estos datos indican que la inhibición de la fosforilación constitutiva de Fgfr3 por A31 rescata el recambio del receptor.

EJEMPLO 6: A31 modula la expresión de genes reguladores del ciclo celular.

[0114] El análisis de la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), un marcador Sphase, reveló niveles anormalmente altos de PCNA en las áreas prehipertróficas (PH) (73% del total de células positivas; $p < 0,005$) e hipertrófica (H) de placas de crecimiento de ratones Fgfr3^{Y367C/+} (43% del total de células positivas; $p < 0,005$). A31 disminuyó fuertemente la expresión de PCNA en las áreas correspondientes de las placas de crecimiento de mutantes (20% y 18% para las áreas de PH y H, respectivamente, $***p < 10^{-4}$) (Figura 6A). Asimismo, se observaron mayores niveles de expresión de Ki67 en las áreas PH y H de placas de crecimiento de ratones Fgfr3^{Y367C/+} en comparación con los controles (datos no mostrados). A31 también disminuyó esta expresión en placas de crecimiento de ratones Fgfr3^{Y367C/+} (datos no mostrados). Los inventores observaron una mayor expresión de PCNA que Ki67 en la placa de crecimiento de mutantes. Además, los inventores investigaron si la presencia de Fgfr3 mutado provocó un deterioro de la expresión de reguladores del ciclo celular. De hecho, el Fgfr3 activado indujo una sobreexpresión significativa de la ciclina D1 en los condrocitos proliferativos y PH de ratones Fgfr3^{Y367C/+}. Curiosamente, A31 devolvió la expresión de ciclina D1 a niveles de control en fémures mutantes (datos no mostrados). En consonancia con esto, las transferencias Western mostraron un nivel reducido de la ciclina D1 en condrocitos murinos tratados con A31 aislados de costillas E16.5 en comparación con condrocitos no tratados (Figura 6B). Los inventores analizaron adicionalmente el nivel de los inhibidores de CDK (CDKIs) que regulaban negativamente el ciclo celular, en particular p57, un miembro de la familia Cip/Kip. El Fgfr3 activado indujo una mayor expresión de p57 predominantemente en condrocitos proliferativos y PH tardíos. A31 redujo la expresión de la proteína p57 en particular en la zona de PH y permitió que los condrocitos PH se diferenciaran correctamente en condrocitos H (datos no mostrados). Los inventores concluyen que FGFR3 activado conduce a la sobreexpresión de marcadores de proliferación (PCNA, Ki67) y reguladores del ciclo celular (ciclina D1 y p57) en particular en la zona prehipertrófica. Estos datos ponen de relieve la desregulación del ciclo celular en esta patología esquelética.

EJEMPLO 7: Efecto de PD173074 en un modelo de enanismo en ratón.

[0115] La eficacia de PD173074 en la atenuación del fenotipo del enanismo de ratones Fgfr3^{Y367C+} se evaluó in vivo. Los ratones tenían siete días de vida al inicio del tratamiento y recibieron administraciones subcutáneas diarias de 4,00 mg/kg de PD173074 durante 10 días.

[0116] Los resultados de este experimento se describen en la figura 8, que es un análisis por rayos X de ratones Fgfr3^{Y367C/+} administrados con PD173074 o con un vehículo (experimento "simulado"). Se observó mejora en las características clínicas relevantes clave de la acondroplasia, incluyendo fémur y tibia inclinados, mordida cruzada anterior y el cráneo en forma de huevo (veáanse las figuras 8A y B; comparar ratón tratado con PD173074 en el lado izquierdo de los paneles A y B vs ratón administrado con vehículo en el lado derecho de los paneles A y B). De

hecho, se observan cambios fenotípicos drásticos, incluyendo patas y dedos más grandes, y tibia y fémures más largos y derechos en ratón $Fgfr3^{Y367C/+}$ tratado con PD173074.

5 [0117] Por lo tanto, la mejora en el enanismo era evidente después de 10 días de tratamiento en animales que recibieron 4,00 mg/kg de PD173074 e incluyó un aumento general en el tamaño del cuerpo con una cola y hocico más largos.

EJEMPLO 8: Efecto de BGJ-398 en un modelo de enanismo de ratón.

10 [0118] Ratonos de siete días de vida recibieron administraciones subcutáneas diarias de 1,66 mg/kg de BGJ-398 durante 10 días.

15 [0119] Se observan cambios fenotípicos drásticos, incluyendo patas y dedos más grandes, y tibia y fémures más largos y derechos en ratón $Fgfr3^{Y367C/+}$ tratado con BGJ-398 (véase la Figura 11 que son rayos X de ratones $Fgfr3^{Y367C/+}$ administrados con BGJ-398, ratón en el lado izquierdo de la figura, o con un vehículo (experimento "simulado"), ratón en el lado derecho de la figura).

LISTADO DE SECUENCIAS

20 [0120]

<110> INSERM

25 <120> ANTAGONISTA DEL RECEPTOR 3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFR3)

<130> BET 12P3221

<160> 1

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 806

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 668 499 T3

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

ES 2 668 499 T3

Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly
 180 185 190

Arg Glu Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
 195 200 205

Gln Gln Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly
 210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr
 225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
 245 250 255

Ala Gly Leu Pro Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu
 260 265 270

Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
 275 280 285

Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro
 290 295 300

Tyr Val Thr Val Leu Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu
 305 310 315 320

Leu Glu Val Leu Ser Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu
 325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala
 340 345 350

Trp Leu Val Val Leu Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu
 355 360 365

Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe
 370 375 380

Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser
 385 390 395 400

Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg
 405 410 415

Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Met Ser
 420 425 430

ES 2 668 499 T3

Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly
435 440 445

Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys
450 455 460

Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu
465 470 475 480

Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys
485 490 495

Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp
500 505 510

Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met
515 520 525

Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
530 535 540

Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
545 550 555 560

Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
565 570 575

Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
580 585 590

Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
595 600 605

Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
610 615 620

Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
625 630 635 640

Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
645 650 655

Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
660 665 670

His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
675 680 685

ES 2 668 499 T3

Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
 690 695 700

 Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
 705 710 715 720

 His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
 725 730 735

 Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
 740 745 750

 Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
 755 760 765

 Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
 770 775 780

 Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
 785 790 795 800

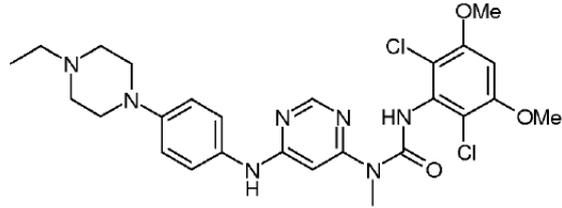
 Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 805

REIVINDICACIONES

1. Antagonista del FGFR3 de fórmula:

5

10



15

o una composición que comprende dicho antagonista para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3.

20

2. Antagonista o la composición para usar, según la reivindicación 1, en los que la displasia esquelética relacionada con FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en displasia tanatofórica de tipo I, displasia tanatofórica de tipo II, acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acanthosis nigricans, hipocondroplasia, acondroplasia y craneosinostosis relacionada con FGFR3, tal como el síndrome de Muenke y el síndrome de Crouzon con acanthosis nigricans.

25

3. Antagonista o la composición para usar, según la reivindicación 2, en los que la enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 es la acondroplasia.

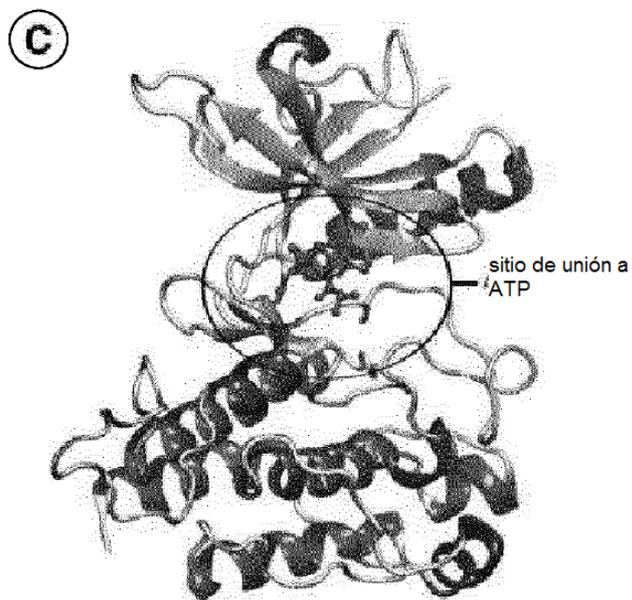
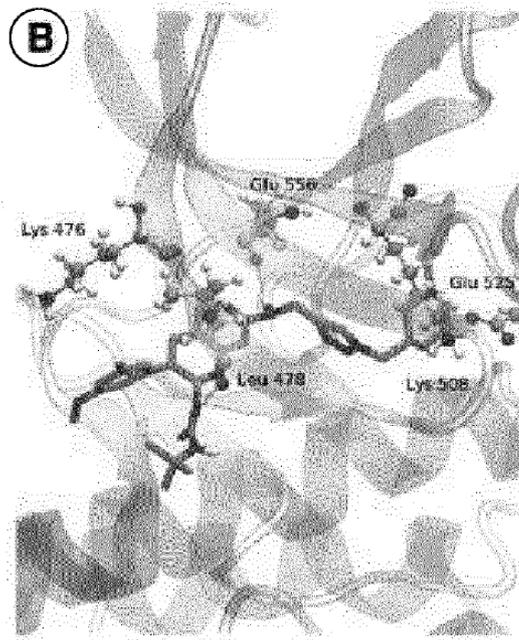
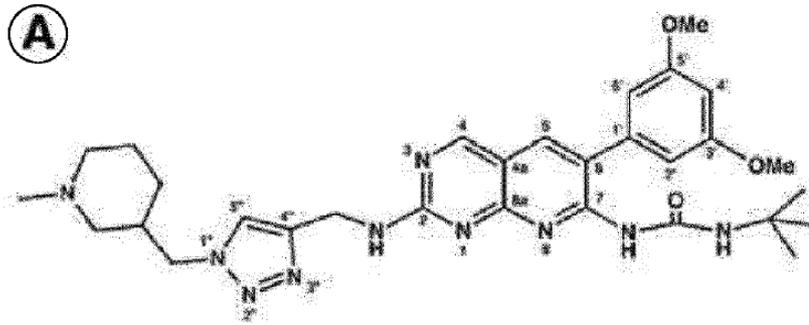


Figura 1

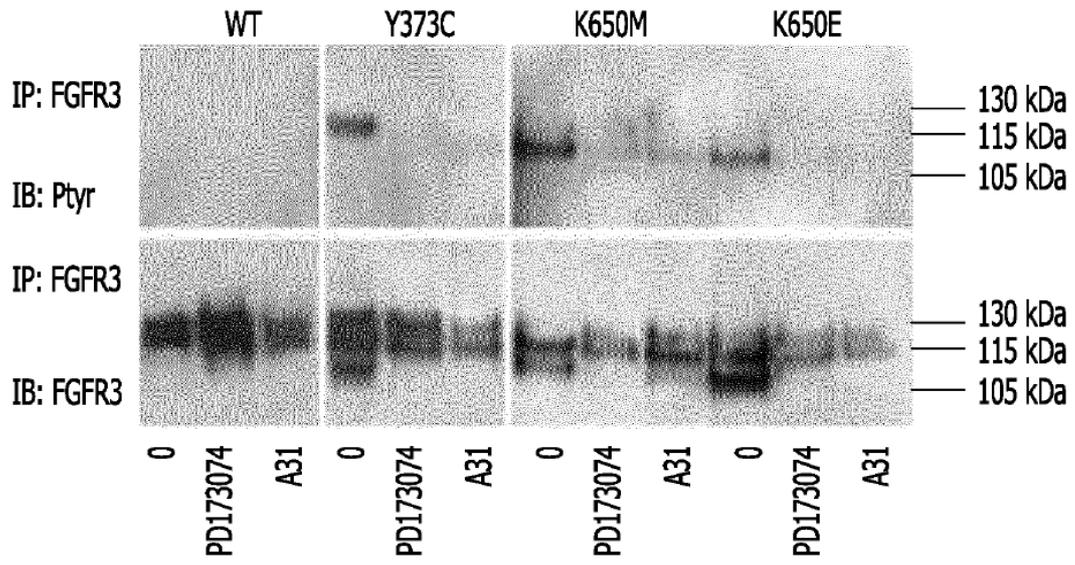


Figura 2

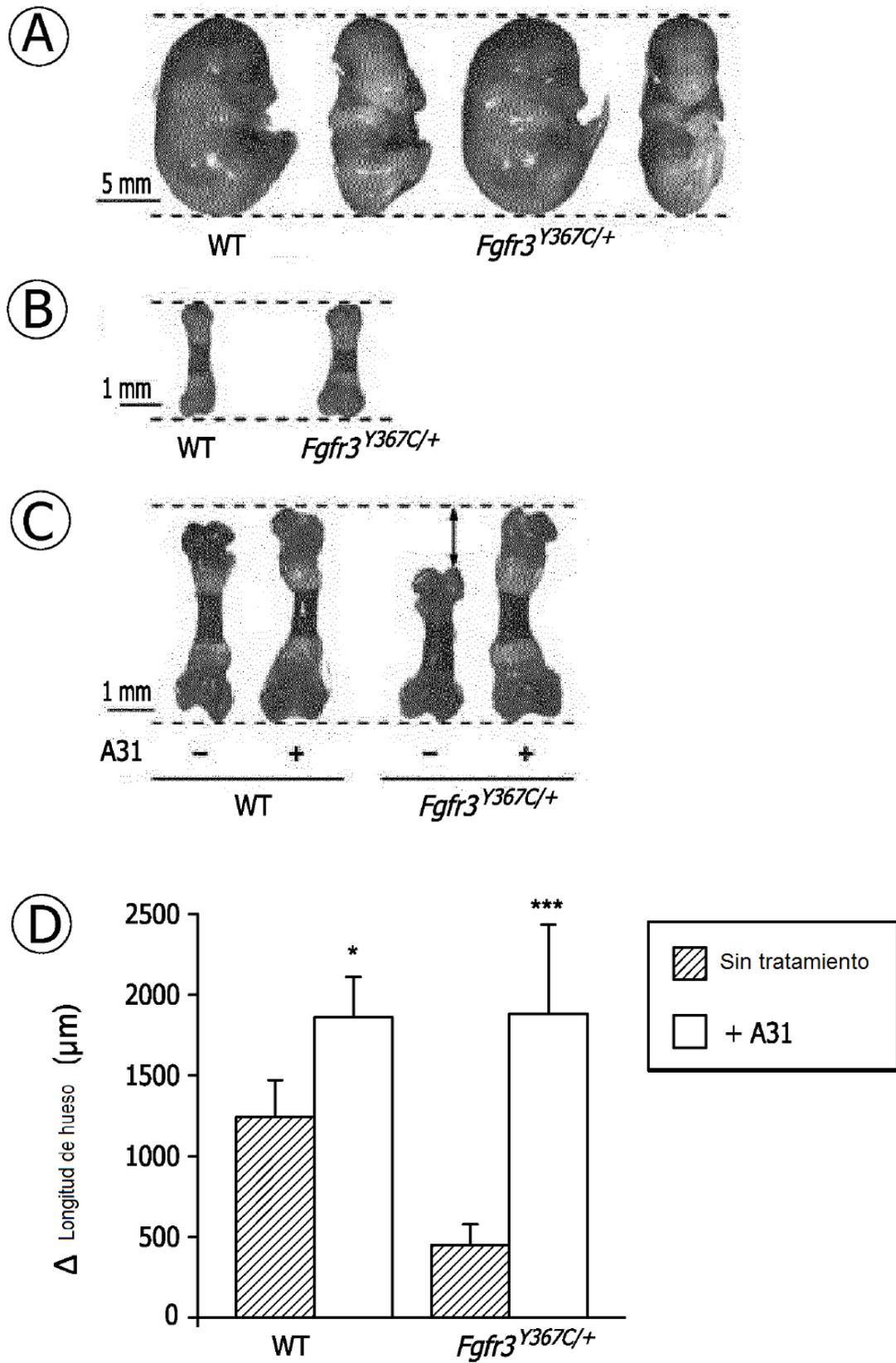


Figura 3

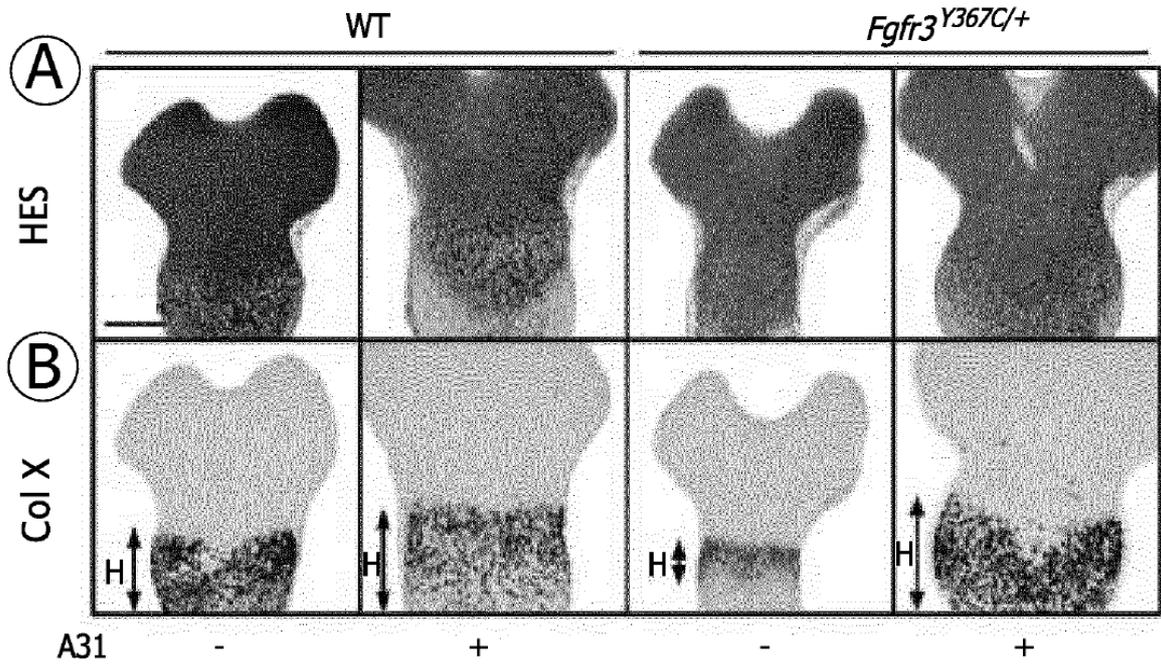


Figura 4

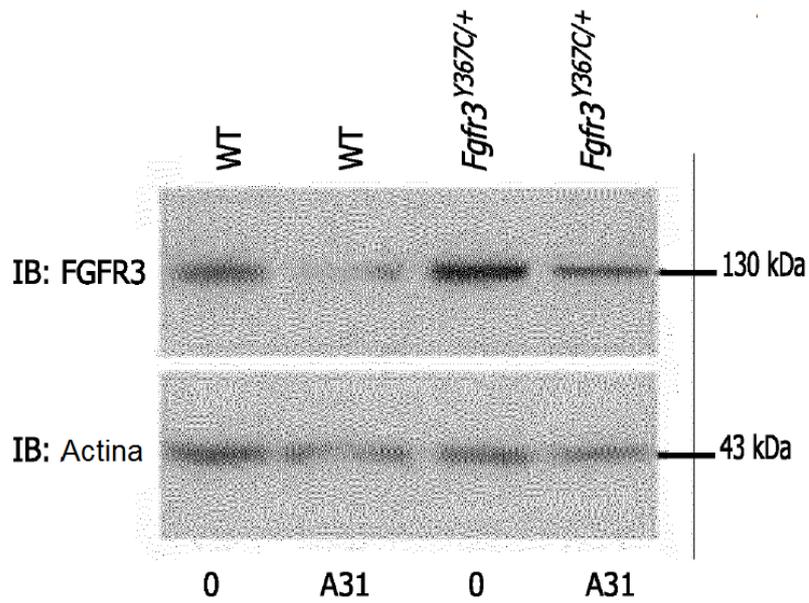


Figura 5

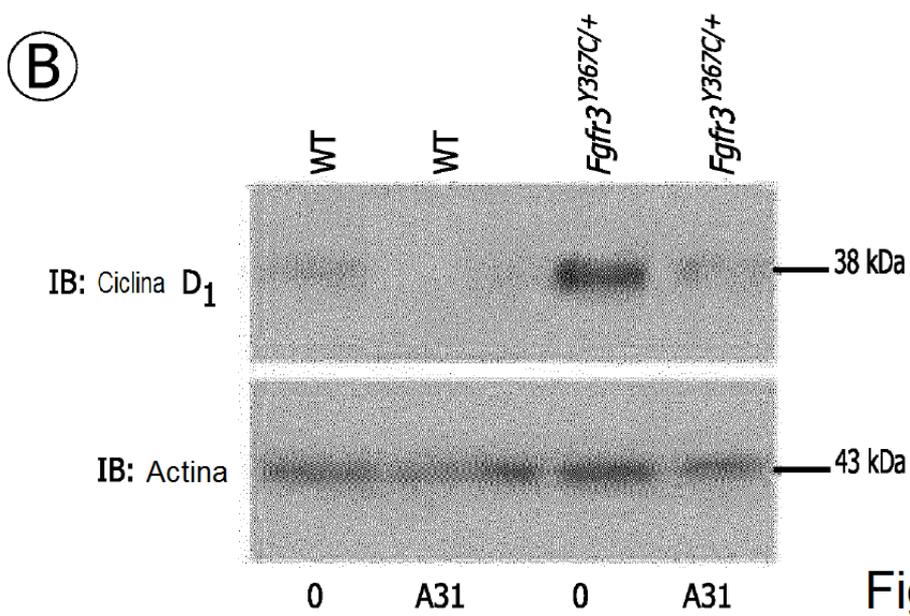
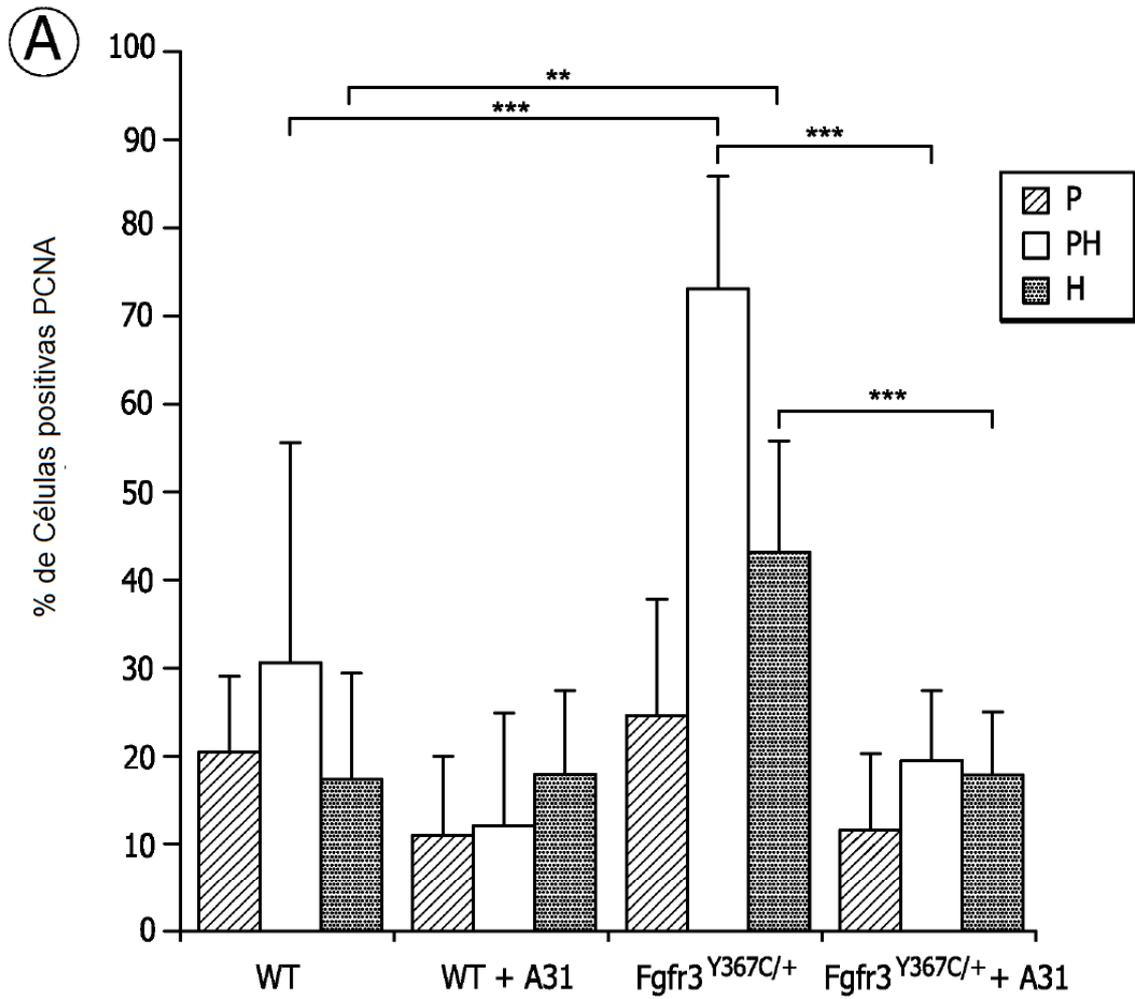


Figura 6

Figura 7

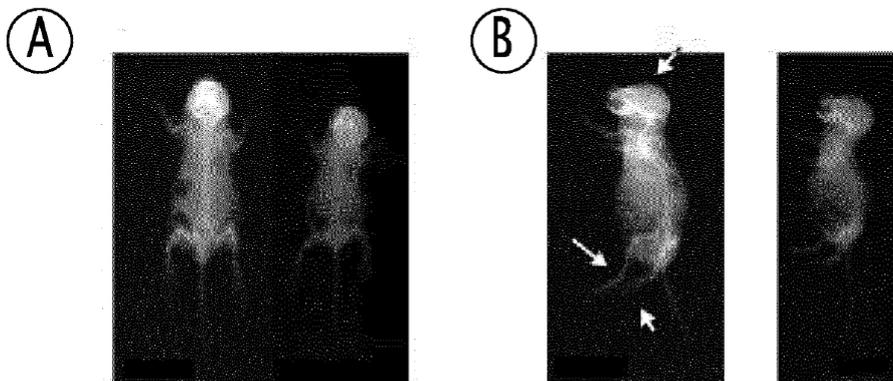
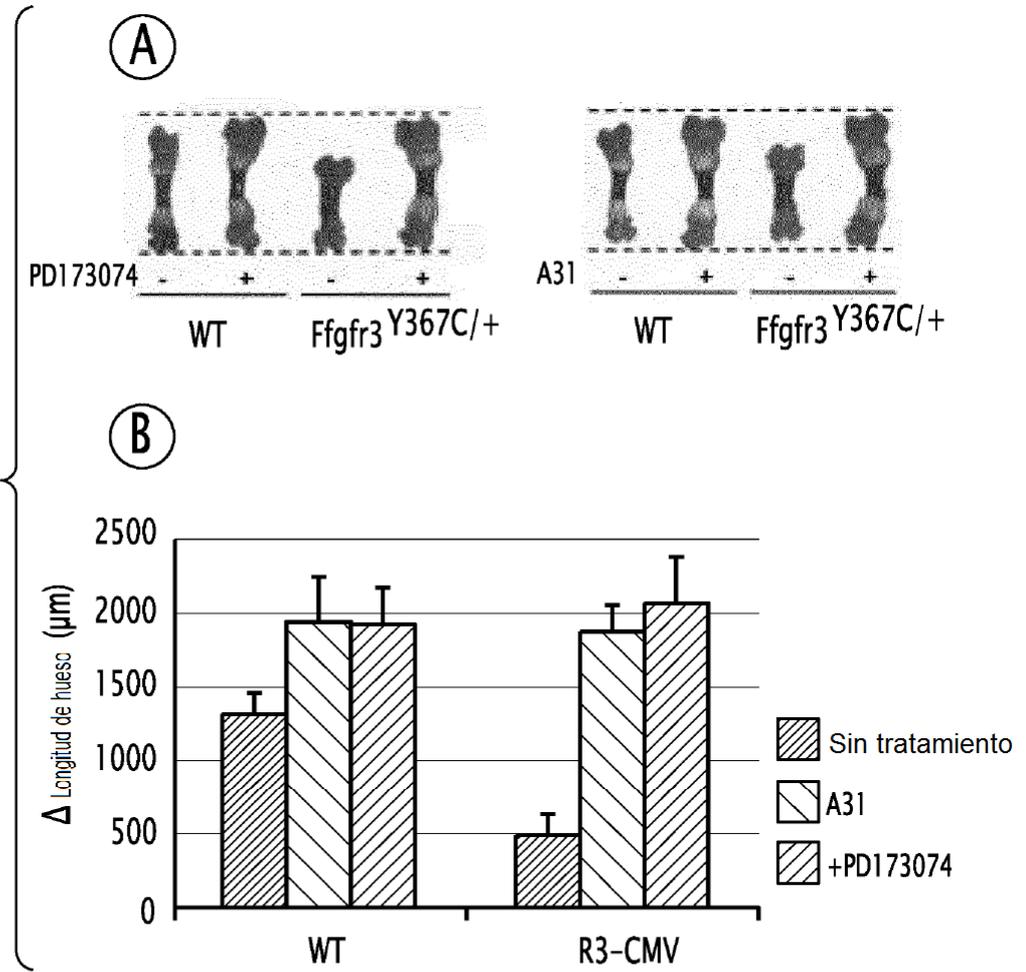


Figura 8

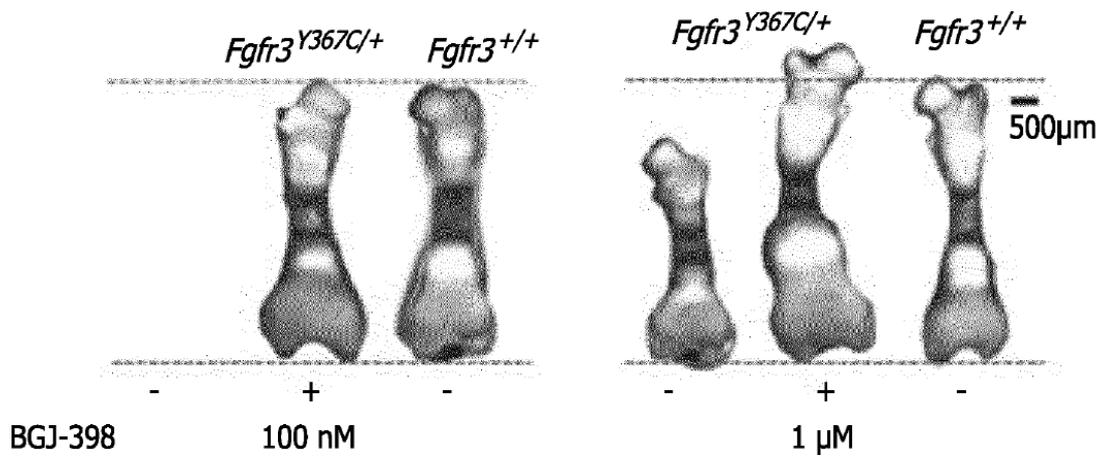


Figura 9

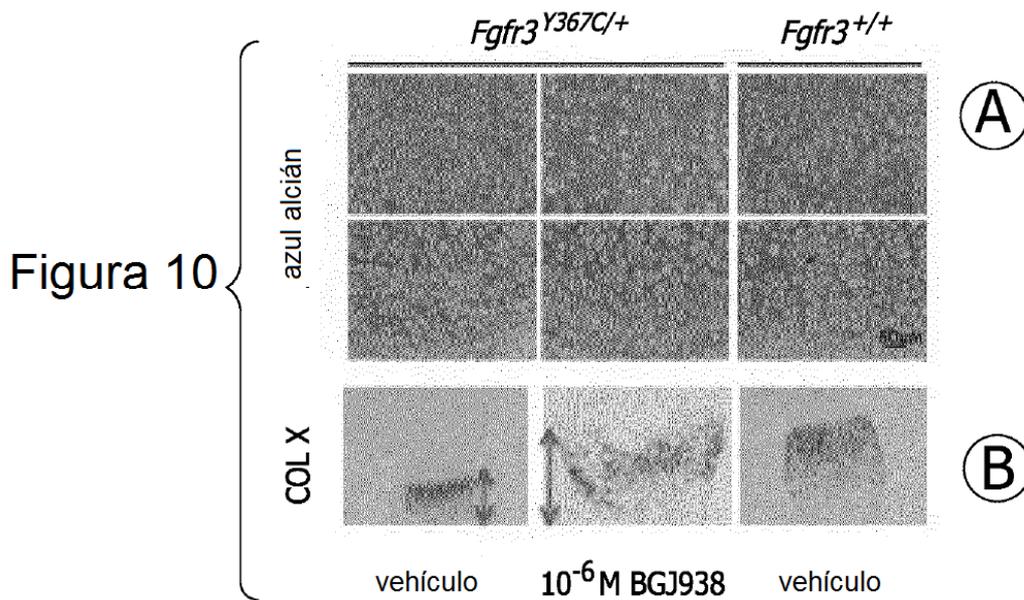


Figura 10



Figura 11