

TRATAMIENTO DE DEPOSICIÓN ANORMAL DE GRASA VISCERAL
UTILIZANDO POLIPÉPTIDOS DE RECEPTOR 3 DE FACTOR DE
CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS SOLUBLE (SFGFR3)

5

Campo y Antecedentes de la Invención

La acondroplasia, la forma más común de enanismo de extremidades cortas, es una enfermedad genética rara para la cual no existe ninguna cura. En muchos pacientes, una sustitución de G380R en el dominio transmembrana del receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) (Fgfr3ach) da por resultado una ganancia de función, prolongando la señalización intracelular de MAPK. En la placa de crecimiento, la señalización de MAPK es inhibidora y su activación constitutiva posterior da por resultado la inhibición de proliferación y diferenciación de condrocitos. Las células que expresan el receptor mutante no maduran y no se reemplazan por matriz ósea mineralizada, dando por resultado al final huesos anormalmente cortos.

La acondroplasia está también caracterizada por obesidad temprana que representa un problema principal de salud en estos pacientes, que afecta aproximadamente el 50% de los pacientes durante la niñez. La obesidad incrementa la morbilidad asociada con la lordosis lumbar, así como el impacto físico de complicaciones ortopédicas existentes, incrementando, por ejemplo, el peso de soporte en rodillas ya

frágiles. También puede incrementar el riesgo de complicaciones serias, tal como riesgos cardiovasculares, apnea obstructiva del sueño, o enfermedad pulmonar restrictiva. Las causas de esta susceptibilidad incrementada a la obesidad en pacientes con acondroplasia no se conocen, pero no parece que estén ligadas con disfunción hormonal o neurológica que pueda conducir a disfunción de apetito, tal como la hiperfagia.

Los pacientes acondroplásicos obesos pueden también padecer de complicaciones metabólicas asociadas, tal como dislipidemia, bajos niveles de insulina, y disfunción de glucosa. No es claro si estas complicaciones están aisladas y relacionadas con factores exógenos, tal como ingesta calórica excesiva y/o actividad física disminuida, o si en realidad reflejan un defecto subyacente en la acondroplasia.

La deposición anormal de grasa y, más en particular, la deposición anormal de grasa visceral, en la población general también está asociada con el desarrollo de enfermedades específicas, que incluyen enfermedades cardiovasculares, metabólicas, pulmonares, reproductivas y neurológicas. Existe una necesidad de terapias para tratar o prevenir el desarrollo de deposición anormal de grasa visceral y sus enfermedades asociadas.

Breve Descripción de la Invención

En un primer aspecto, la solicitud describe un método

para tratar o reducir la deposición anormal de grasa (por ejemplo, deposición de grasa visceral) en un sujeto (por ejemplo, un humano, tal como un feto, neonato, infante, niño, adolescente o adulto) en necesidad del mismo al administrar

5 un polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos soluble (sFGFR3), un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3, o una célula hospedadora que contiene el polinucleótido que codifica para el mismo al sujeto. En varias modalidades, la deposición anormal de grasa

10 visceral se asocia con, o circunda, uno o más de los siguientes órganos: corazón, hígado, bazo, riñones, páncreas, intestinos, órganos reproductivos, y vesícula biliar; o la deposición anormal de grasa visceral provoca enfermedad en uno o más de los siguientes órganos: el corazón, pulmones,

15 tráquea, hígado, páncreas, cerebro, órganos reproductivos, arterias, y vesícula biliar; o la deposición anormal de grasa visceral se produce por disfunción en un órgano endocrino, tal como una glándula adrenal, una glándula pituitaria o un órgano reproductivo, tal como un ovario. El método puede dar

20 por resultado la reducción o eliminación de, o riesgo disminuido de desarrollar, una o más condiciones asociadas con la distribución anormal de grasa, tal como apnea obstructiva del sueño, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, enfermedad

25 neurológica, dislipidemia, hipertensión, aterosclerosis,

infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, demencia, infertilidad, irregularidades menstruales, disfunción de insulina, y disfunción de glucosa. En particular, la dislipidemia es un nivel anormal de uno o más de triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y colesterol; la enfermedad cardiovascular es enfermedad cardíaca o accidente cerebrovascular; la enfermedad pulmonar es asma y enfermedad pulmonar restrictiva; la enfermedad neurológica es demencia o enfermedad de Alzheimer; la enfermedad metabólica es diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, enfermedad de hígado graso no alcohólico y toxicidad hepática; la disfunción de insulina es resistencia a la insulina.

En una modalidad, el sujeto que tiene deposición anormal de grasa no tiene sobrepeso, carece de deposición de grasa subcutánea sustancial y/o puede no exhibir deposición anormal de grasa sustancial fuera del abdomen. La deposición anormal de grasa puede determinarse utilizando técnicas antropométricas (por ejemplo, Índice de masa corporal (IMC) o proporción de grasa androide:ginoide) o imagenología (por ejemplo, tomografía computarizada (CT), imagenología por resonancia magnética (MRI) y absorciometría con rayos de doble energía (DXA), métodos que pueden detectar distribución anormal de grasa en ausencia de otros fenotipos adiposos.

En otras modalidades, el sujeto puede tener un

trastorno de retardo de crecimiento esquelético, tal como una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 (por ejemplo, una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 que se produce por expresión en el paciente de una variante de FGFR3

5 que exhibe sobreactivación dependiente de ligandos, tal como una variante de FGFR3 que tiene una sustitución de aminoácido de un residuo de glicina con un residuo de arginina en la posición 358 (G358R), como se expone en SEQ ID NO: 9). La enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 puede incluir,

10 por ejemplo, acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa con retraso de desarrollo y acantosis nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, un síndrome de craneosinostosis (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon y

15 síndrome de Crouzonodermoesquelético), y síndrome de camptodactilia, estatura alta, y síndrome de pérdida auditiva (CATSHL). El paciente con un trastorno de retardo del crecimiento esquelético puede tener uno o más síntomas del trastorno de retardo de crecimiento esquelético seleccionado

20 del grupo que consiste de extremidades cortas, tronco corto, piernas arqueadas, una marcha de ánade, malformaciones craneales, cráneo trilobulado, craneosinostosis, huesos de gusano, anomalías de las manos, anomalías de los pies, dedo pulgar del autostopista y anomalías del pecho. Excluidos de

25 los métodos descritos en la presente puede ser un sujeto con

un trastorno de retardo de crecimiento esquelético, tal como aquellos descritos anteriormente, por ejemplo, acondroplasia, después del cese de crecimiento óseo en el paciente (por ejemplo, un sujeto feto, neonato, infante, niño, y/o

5 adolescente).

En una modalidad alternativa, el paciente no tiene un trastorno de retardo de crecimiento esquelético, pero puede caracterizarse como que tiene obesidad, síndrome de ovario poliquístico o una forma de hipercortisolismo, tal como

10 enfermedad de Cushing.

En otras modalidades, el sFGFR3 tiene al menos 50 aminoácidos consecutivos de un dominio extracelular de un polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) presente de manera natural (por ejemplo,

15 100-370 aminoácidos consecutivos de un dominio extracelular del polipéptido receptor de factor de crecimiento de fibroblastos presente de manera natural (FGFR3) o menos de 350 aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido FGFR3 presente de manera natural). El polipéptido sFGFR3

20 puede tener un dominio tipo C2 y tipo Ig 1, 2 y/o 3 del polipéptido FGFR3 presente de manera natural. El polipéptido sFGFR3, en particular, carece de un péptido señal y/o un dominio transmembrana, tal como el péptido señal y/o dominio transmembrana de un polipéptido FGFR3 presente de manera

25 natural. Alternativamente, el polipéptido sFGFR3 es un

polipéptido maduro. El polipéptido FGFR3 presente de manera natural puede tener la secuencia de aminoácido de número de acceso en Genbank NP_000133.

5 El polipéptido sFGFR3 puede tener 400 aminoácidos consecutivos o menos de un dominio intracelular de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural (por ejemplo, entre 5 y 399 aminoácidos consecutivos, tal como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15 o menos aminoácidos consecutivos, del dominio intracelular de un polipéptido
10 FGFR3 presente de manera natural). El polipéptido sFGFR3 puede tener una secuencia de aminoácido con al menos 90%, 92%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia a aminoácidos 401 a 413 de SEQ ID NO: 8 (por ejemplo, el polipéptido sFGFR3 puede tener aminoácidos 401 a 413 de SEQ ID NO: 8). En varias
15 modalidades, el polipéptido sFGFR3 carece de un dominio tirosina quinasa de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural, carece de un dominio intracelular de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural o es menor que 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 aminoácidos de
20 longitud. En otras modalidades, el polipéptido sFGFR3 tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86% -100% de identidad de secuencia) a residuos de aminoácidos 1 a 280 de SEQ ID NO: 8. En aun otras modalidades, el polipéptido sFGFR3 tiene una secuencia
25 de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia

(por ejemplo, 86%-100% de identidad de secuencia) a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1-7. El polipéptido sFGFR3 también puede tener un péptido señal, tal como un péptido señal de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural (por ejemplo, un péptido señal que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21). El polipéptido sFGFR3 también puede tener un polipéptido heterólogo (por ejemplo, una región de fragmento cristalizable de una inmunoglobulina (región Fc) o albúmina de suero humana (HSA)).

10 En aun otras modalidades, el polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 puede tener una secuencia de ácido nucleico con al menos 85% y hasta 100% de identidad de secuencia a la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 10-18 (por ejemplo, el polinucleótido puede consistir de la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de una de SEQ ID NO: 10-18). El polinucleótido puede ser un polinucleótido aislado y/o puede estar en un vector (por ejemplo, un vector seleccionado del grupo que consiste de un plásmido, un cromosoma artificial, un vector viral, y un vector de fago). El vector puede estar en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula hospedadora aislada, tal como una célula hospedadora que es del sujeto o una célula HEK 293 o célula CHO). La célula hospedadora también puede transformarse con el polinucleótido que codifica para sFGFR3.

25 En otras modalidades, el polipéptido sFGFR3 se une a

un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), en donde el FGF se selecciona del grupo que consiste de factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF9), factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10), factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF18), factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19), factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). La unión al FGF se puede caracterizar por una constante de disociación de equilibrio (K_d) de aproximadamente 0.2 nM a aproximadamente 20 nM, o por una K_d de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM (por ejemplo, la K_d es aproximadamente 1 nm, aproximadamente 2 nm, aproximadamente 3 nm, aproximadamente 4 nm, aproximadamente 5 nm, aproximadamente 6 nm, aproximadamente 7 nm, aproximadamente 8 nm, aproximadamente 9 nm o aproximadamente 10 nm).

Un aspecto del tratamiento implica administrar un polipéptido sFGFR3, un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 o una célula hospedadora que contiene un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, tal como un sujeto humano sin tratamiento previo que no se ha tratado con un polipéptido sFGFR3). El polipéptido sFGFR3 se puede administrar en una composición que contiene un excipiente,

portador, o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dosis posibles son de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg). La administración puede ser

5 diaria, semanalmente, o mensualmente. La periodicidad de dosificación puede ser siete veces a la semana, seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas, o una vez al mes. La ruta de dosificación

10 puede ser subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraperitoneal, parenteral, enteral, o tópica. Se puede repetir la administración.

En otras modalidades, el polipéptido sFGFR3 tiene una vida media *in vivo* de entre aproximadamente 2 horas a

15 aproximadamente 25 horas.

Un segundo aspecto de la invención ofrece una composición que contiene un polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos soluble (sFGFR3), un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 o una

20 célula hospedadora que contiene el polinucleótido para tratar o reducir distribución anormal de grasa en un sujeto en necesita del mismo (por ejemplo, un sujeto humano), por ejemplo, de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención.

25 Un tercer aspecto de la invención ofrece el uso de un

polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos soluble (sFGFR3), un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3, o una célula hospedadora que contiene un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 en la fabricación de un medicamento para tratar o reducir distribución anormal de grasa en un sujeto en necesidad del mismo (por ejemplo, un sujeto humano), por ejemplo, de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención.

10 **Definiciones**

Como se usa en la presente, "uno" y "una" significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que se indique lo contrario. Además, las formas singulares "uno", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

La frase "deposición anormal de grasa visceral" se refiere a un nivel de deposición de grasa en el epiplón, mesenterio, retroperitoneo y pericardio, que es mayor que un nivel de deposición de grasa observada en un sujeto normal, como se determina por técnicas antropométricas o técnicas de imagenología (ver, por ejemplo, "Methods of Diagnosis, *infra.*, para enumeración de valores de cada técnica que define un límite que distingue deposición de grasa visceral normal de anormal". Por ejemplo, sujetos con deposición anormal de grasa visceral son aquellos que exhiben un valor

de deposición de grasa visceral que es igual a o mayor que 10% por encima (por ejemplo, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 500%, 750%, 1000% o más por encima) de un límite para deposición de grasa visceral con respecto a
5 aquel de un sujeto normal. Comúnmente, la deposición anormal de grasa visceral se asocia con un subconjunto de pacientes obesos, por ejemplo, aquellos con un IMC >30 kg/m². La deposición anormal de grasa visceral puede dar por resultado una variedad de condiciones. Estas incluyen, por ejemplo,
10 síndromes de retardo de crecimiento esquelético (por ejemplo, acondroplasia), hipercortisolismo (por ejemplo, enfermedad de Cushing), y síndrome de ovario poliquístico.

Como se usa en la presente, "aproximadamente" se refiere a una cantidad que es $\pm 10\%$ del valor recitado y de
15 manera preferente $\pm 5\%$ del valor recitado, o de manera más preferente $\pm 2\%$ del valor recitado. Por ejemplo, el término "aproximadamente" se puede utilizar para modificar todas las dosis o intervalos recitados en la presente por $\pm 10\%$ de los valores recitados o puntos finales de intervalo.

20 La frase "técnicas antropométricas" se refiere a medidas de composición corporal basadas en altura, peso, circunferencia de la cintura y circunferencia de caderas, que incluyen índice de masa corporal (IMC), proporción de grasa androide:ginoide, circunferencia de la cintura, y diámetro
25 sagital (SD); ver, por ejemplo, Shuster et al., Br. J.

Radiol. 85 (1009): 1-10, 2012).

La frase "enfermedad cardiovascular" se refiere a enfermedades de corazón y vasos sanguíneos, en particular, aterosclerosis, infarto de miocardio, e hipertensión.

5 La frase "condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral" se refiere a enfermedades observadas en pacientes cuya deposición de grasa visceral se muestra que es anormal con respecto a pacientes normales. En particular, estas condiciones incluyen enfermedad
10 cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad metabólica, enfermedad reproductiva, y enfermedad neurológica.

El término "dominio" se refiere a región conservada de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido FGFR3) que tiene una estructura y/o
15 función identificable dentro del polipéptido. Un dominio puede variar en longitud de, por ejemplo, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 600 aminoácidos. Dominios de ejemplo incluyen los dominios inmunoglobulina de un FGFR3 (por ejemplo, dominio tipo C2 y tipo Ig 1, dominio tipo C2 y
20 tipo Ig 2, y dominio tipo C2 y tipo Ig 3), el dominio extracelular (ECD) de un FGFR3, el dominio intracelular (ICD) de un FGFR3, o el dominio transmembrana (TM) de un FGFR3, tal como un FGFR3 que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8).

25 El término "dosis" se refiere a una cantidad

determinada de un agente activo (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o variante del mismo, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 1-7 o una variante de la misma que tiene al menos 85% a 100% de
5 identidad de secuencia a las mismas) calculada para producir un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, tratamiento de deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición de grasa visceral) cuando el agente activo se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente
10 que tiene deposición anormal de grasa visceral, o una condición asociada con deposición de grasa visceral). Una dosis se puede definir en términos de una cantidad definida del agente activo o una cantidad definida acoplado con una frecuencia particular de administración. Una forma de dosis
15 puede incluir un polipéptido sFGFR3 o un fragmento del mismo en asociación con cualquier excipiente, portador, o diluyente farmacéutico adecuado.

Los términos "cantidad efectiva", "cantidad efectiva para" y "cantidad terapéuticamente efectiva" se refieren a
20 una cantidad de un polipéptido sFGFR3, un vector que codifica para un sFGR3 y/o una composición de sFGFR3 que es suficiente para producir un resultado deseado, por ejemplo, deposición anormal de grasa disminuida, deposición anormal de grasa visceral, o una disminución de síntomas asociados con
25 condiciones ligadas a deposición anormal de grasa visceral.

Los términos "dominio extracelular" y "ECD" se refieren a la porción de un polipéptido FGFR3 que se extiende más allá del dominio transmembrana en el espacio extracelular. El ECD media unión de un FGFR3 a uno o más factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). Por ejemplo, un ECD incluye los dominios tipo C2 y tipo Ig 1-3 de un polipéptido FGFR3. En particular, el ECD incluye el dominio tipo C2 y tipo Ig 1 de un polipéptido FGFR3 de tipo salvaje (wt), el dominio tipo C2 y tipo Ig 2 de un polipéptido FGFR3 de tipo salvaje (wt) y/o el dominio tipo C2 y tipo Ig 3 de un polipéptido FGFR3 wt. Un ECD de un FGFR3 también puede incluir un fragmento del dominio tipo C2 y tipo Ig FGFR3 de tipo salvaje, a manera de ejemplo.

La frase "deposición de grasa" se refiere a deposición de grasa visceral o deposición de grasa subcutánea.

El término "enfermedad esquelética relacionada con FGFR3", como se utiliza en la presente, se refiere a una enfermedad esquelética que se produce por un incremento anormal en la activación de FGFR3, tal como por expresión de una mutación de ganancia de función del FGFR3. La frase "mutación de ganancia de función del FGFR3" se refiere a una mutación del FGFR3 que exhibe una actividad biológica, tal como activación de señalización corriente abajo, que es mayor que la actividad biológica del FGFR3 de tipo salvaje

correspondiente (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8) en la presencia de un ligando de FGF. Las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 pueden incluir una enfermedad hereditaria o

5 esporádica. Las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa con retraso de desarrollo y acantosis nigricans (SADDAN),

10 hipocondroplasia, un síndrome de craneosinostosis por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, y síndrome de Crouzonodermoesquelético), y síndrome de camptodactilia, estatura alta, y pérdida auditiva (CATSHL).

Los términos "factor de crecimiento de fibroblastos" y "FGF" se refieren a un miembro de la familia FGF, que

15 incluye moléculas de señalización estructuralmente relacionadas implicadas en diferentes procesos metabólicos, que incluyen rutas de señalización endocrinas, desarrollo, cicatrización de heridas, y angiogénesis. Los FGF juegan

20 papeles clave en la proliferación y diferenciación de una amplia gama de tipos celulares y tisulares. El término se refiere de manera preferente a FGF1, FGF2, FGF9, FGF 10, FGF18, FGF19, FGF21 y FGF23, que se han mostrado que se unen a FGFR3. Por ejemplo, los FGF pueden incluir FGF1 humano (por

25 ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 26), FGF2 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27), FGF9 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28), FGF10 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40), FGF18 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29), FGF19 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30), FGF21 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31) y FGF23 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41).

Los términos "receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos", "FGFR3" o "receptor de FGFR3", como se utilizan en la presente, se refieren a un polipéptido que se une específicamente a uno o más FGF (por ejemplo, FGF1, FGF2, FGF9, FGF10, FGF18, FGF19, FGF 21 y/o FGF23). El gen FGFR3 humano, que está ubicado en el brazo corto distal del cromosoma 4, codifica un precursor de proteína de 806 aminoácidos (precursor de isoforma 1 de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos), que contiene 19 exones, e incluye un péptido señal (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21). Mutaciones en la secuencia de aminoácidos de FGFR3 que conducen a trastornos de crecimiento esquelético (por

ejemplo, acondroplasia) incluyen, por ejemplo, la sustitución de un residuo de glicina en la posición 358 con un residuo de arginina (es decir, G358R; SEQ ID NO: 9). El gen FGFR3 humano presente de manera natural tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en el número de acceso en Genbank NM_000142.4 y la proteína FGFR3 humana presente de manera natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso en Genbank NP_000133, representada en la presente por SEQ ID NO: 8. El FGFR3 de tipo salvaje (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8) consiste de un dominio membrana tipo inmunoglobulina extracelular que incluye dominios tipo C2 y tipo Ig 1-3, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular. Los FGFR3 pueden incluir fragmentos y/o variantes (por ejemplo, variantes de empalme, tal como variantes de empalme que utilizan exón alternativo 8 en lugar de exón 9) del FGFR3 de tipo salvaje, de longitud completa.

Los términos "fragmento" y "porción" se refieren a una parte de una totalidad de, tal como un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, de manera preferente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de la longitud completa de la molécula o polipéptido de ácido nucleico de referencia, o un dominio del mismo (por ejemplo, el ECD, ICD o TM de un polipéptido sFGFR3). Un fragmento o porción puede

contener, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 5 390, 400, 500, 600, 700 o más residuos de aminoácidos consecutivos, hasta la longitud completa del polipéptido de referencia. Por ejemplo, un fragmento de FGFR3 puede incluir cualquier polipéptido que tiene al menos aproximadamente 5 aminoácidos consecutivos a aproximadamente 300 aminoácidos consecutivos, incluyendo los puntos finales, por ejemplo, al 10 menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, o 300 aminoácidos consecutivos de cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-8. 15

La frase "disfunción de glucosa" se refiere a un nivel de glucosa en la sangre que está por encima o por debajo de un intervalo normal aceptable.

Como se utiliza en la presente, el término "célula 20 hospedadora" se refiere a un vehículo que incluye los componentes celulares necesarios, por ejemplo, organelos, necesarios para expresar un polipéptido sFGFR3 de un polinucleótido correspondiente. La secuencia de ácido nucleico del polinucleótido está incluida habitualmente en un 25 vector de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido, un

cromosoma artificial, un vector viral, o un vector de fago) que se puede introducir en la célula hospedadora por técnicas convencionales conocidas en la técnica (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, y microinyección directa). Una célula hospedadora puede ser una célula procariótica, por ejemplo, una célula bacteriana o arqueal, o una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de mamífero (por ejemplo, una célula de ovario de hámster Chino (CHO) o un riñón embrionario humano 293 (HEK 293)). De manera preferente, la célula hospedadora es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

La frase "técnicas de imagenología" se refiere a métodos para crear representaciones visuales del interior de un cuerpo para propósito de análisis clínicos e intervención médica. Ejemplos de técnicas de imagenología incluyen, por ejemplo, absorciometría con rayos X de doble energía (DXA) que produce índice de masa grasa, imagenología de sección transversal, tal como tomografía computarizada (CT) e imagenología por resonancia magnética (MRI), que produce un área de grasa visceral en cm^2 a un nivel especificado de la columna lumbar (ver, por ejemplo, Shuster et al., *supra*).

La frase "disfunción de insulina" se refiere a un nivel de insulina en la sangre que está por encima o por debajo de un intervalo normal aceptable.

Por "aislado" se entiende separado, recuperado, o purificado de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 aislado (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o variante del mismo, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7 o una variante de la misma que tiene al menos aproximadamente 85% hasta aproximadamente 100% de identidad de secuencia a la misma) se puede caracterizar por un cierto grado de pureza después del aislamiento del polipéptido sFGFR3 de, por ejemplo, medio de cultivo celular. Un polipéptido sFGFR3 aislado puede al menos ser 75% puro, de tal forma que el polinucleótido sFGFR3 constituye al menos 75% en peso del material total (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos, restos celulares, y contaminantes ambientales) presente en la preparación (por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 99% o al menos 99.5% en peso del material total presente en la preparación). Del mismo modo, un polinucleótido aislado que codifica para un polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de una de SEQ ID NO: 10-18 o una variante de la misma que tiene al menos aproximadamente 85% hasta aproximadamente 100% de identidad de secuencia a la misma), o una célula hospedadora aislada (por ejemplo, célula CHO, célula HEK 293, célula L, célula C127, célula 3T3, célula

BHK, célula COS-7, o una célula de un sujeto) que contiene el polinucleótido puede ser al menos 75% puro, de tal forma que el polinucleótido o la célula hospedadora constituye al menos 75% en peso del material total (por ejemplo, polipéptidos, 5 polinucleótidos, restos celulares, y contaminantes ambientales) presente en la preparación (por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 99%, o al menos 99.5% en peso del material total presente en la preparación).

10 La frase "enfermedad metabólica" se refiere a trastornos de reacciones químicas que ayudan con procesamiento de energía, en particular dislipidemia, disfunción de insulina, disfunción de glucosa, hígado graso no alcohólico, y toxicidad hepática.

15 La frase "enfermedad neurológica" se refiere a enfermedades del cerebro o nervios, en particular, demencia y accidente cerebrovascular.

Los términos "administración parenteral", "administrado de forma parenteral" y otras frases 20 gramaticalmente equivalentes, como se utilizan en la presente, se refieren a un modo de administración de composiciones que incluyen un polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o una variante del mismo, tal como un polipéptido que tiene el secuencia de aminoácidos de 25 cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7 (con o sin un péptido

señal) diferente de administración enteral y tópica, por lo general por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección o infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, intracerebral, intracraneal, intracarotídea e intraesternal.

Los términos "paciente" y "sujeto" se refieren a un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un humano (por ejemplo, un humano que tiene deposición anormal de grasa, deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral) o un mamífero no humano (por ejemplo, un mamífero no humano que tiene deposición anormal de grasa, deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral, tal como un bovino, equino, canino, ovino, o felino. De manera preferente, el paciente es un humano que tiene deposición anormal de grasa, deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral), particularmente un feto, un neonato, un infante, un niño, un adolescente o un adulto que tiene deposición anormal de grasa, deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con

deposición anormal de grasa visceral.

Por "composición farmacéutica" se entiende una composición que contiene un agente activo, tal como un sFGFR3, formulado con al menos un excipiente, portador, o
5 diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede fabricar o vender con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico del tratamiento de una enfermedad o evento (por ejemplo, deposición anormal de grasa, deposición anormal de
10 grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral) en un paciente (por ejemplo, un paciente que tiene deposición anormal de grasa, deposición anormal de grasa visceral, o las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa visceral). Se pueden formular
15 composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para administración parenteral, tal como para administración subcutánea (por ejemplo, por inyección subcutánea) o administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril libre de émbolos en partículas y en un sistema de solvente adecuado
20 para uso intravenoso), o para administración oral (por ejemplo, como una tableta, cápsula, comprimido, cápsula de gelatina o jarabe).

Por "diluyente, excipiente, portador, o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se entiende un diluyente,
25 excipiente, portador, o adyuvante, respectivamente, que es

fisiológicamente aceptable al sujeto (por ejemplo, un humano) en tanto que retiene las propiedades terapéuticas de la composición farmacéutica (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o variante del mismo, con el cual se administra. Un portador farmacéuticamente aceptable de ejemplo es solución salina fisiológica. Otros diluyentes, excipientes, portadores, o adyuvantes fisiológicamente aceptables y sus formulaciones se conocen por aquellos expertos en la técnica.

“Polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico”, como se utilizan intercambiabilmente en la presente, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribo-nucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o análogos de los mismos, o cualquier substrato que se puede incorporar en un polímero por ADN o ARN polimerasa o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y análogos de los mismos. Si están presente, se puede impartir modificación a la estructura de nucleótido antes o después del montaje del polímero. La secuencia de los nucleótidos se puede interrumpir por componentes diferentes de nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis, tal como por conjugación con una etiqueta.

La frase “enfermedad pulmonar” se refiere a enfermedades de intercambio de aire, en particular, apnea

obstruktiva del sueño, enfermedad pulmonar restrictiva, y asma.

La frase "enfermedad reproductiva" se refiere a enfermedades del sistema reproductivo, en particular,
5 infertilidad e irregularidades menstruales.

Como se usa en la presente, el término "identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos (o ácido nucleico) de una secuencia candidata, por ejemplo, un polipéptido FGFR3, que son idénticos a los
10 residuos de aminoácidos (o ácido nucleico) de una secuencia de referencia, por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 de tipo salvaje (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8) o un polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o una variante del mismo, tal
15 como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7) después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr la identidad porcentual máxima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de las secuencias
20 candidatas y de referencia para alineación óptima y secuencias no homólogas se pueden ignorar para propósitos de comparación). La alineación para propósitos de determinar identidad porcentual se puede lograr de diferentes formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo,
25 utilizando software de computadora públicamente disponible,

tal como software BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir alineación, que incluyen cualquiera

5 algoritmo necesario para lograr alineación máxima a través de la longitud de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, la identidad de secuencia de aminoácidos (o ácido nucleico) porcentual de una secuencia candidata dada a, con, o contra una secuencia de referencia dada (que puede expresarse como

10 una secuencia candidata dada que tiene o incluye una cierta identidad de secuencia de aminoácidos (o ácido nucleico) porcentual a, con, o contra una secuencia de referencia dada) se calcula como sigue: $100 \times (\text{fracción de } A/B)$ donde A es el número de residuos de aminoácidos (o ácido nucleico)

15 calificados como idénticos en la alineación de la secuencia candidata y la secuencia de referencia, y donde B es el número total de residuos de aminoácidos (o ácido nucleico) en la secuencia de referencia. En particular, una secuencia de referencia alineada por comparación con una secuencia

20 candidata puede mostrar que la secuencia candidata exhibe, por ejemplo, de 50% a 100% de identidad a través de la longitud completa de la secuencia candidata o una porción seleccionada de residuos de aminoácidos contiguos (o ácido nucleico) de la secuencia candidata. La longitud de la

25 secuencia candidata alineada para propósitos de comparación

es al menos 30%, por ejemplo, al menos 40%, por ejemplo, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Cuando una posición en la secuencia candidata se ocupa por el mismo residuo de aminoácido (o
5 ácido nucleico) que la posición correspondiente en la secuencia de referencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

Por "péptido señal" se entiende un péptido corto (por ejemplo, 5-30 aminoácidos de longitud, tal como 22
10 aminoácidos de longitud) en el extremo N-terminal de un polipéptido que dirige un polipéptido hacia la ruta secretora (por ejemplo, el espacio extracelular). El péptido señal se escinde habitualmente durante la secreción del polipéptido. La secuencia señal puede dirigir el polipéptido a un
15 compartimento u organelo intracelular, por ejemplo, el aparato de Golgi. Una secuencia señal puede identificarse por homología, o actividad biológica, a un péptido con la función conocida de dirigir un polipéptido a una región particular de la célula. Una persona experta en la técnica puede
20 identificar un péptido señal al utilizar software fácilmente disponible (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package de Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, o programas PILEUP/PRETTYBOX). Un péptido señal
25 puede ser uno que es, por ejemplo, sustancialmente idéntico a

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

El término "trastorno de retardo de crecimiento esquelético", como se utiliza en la presente, se refiere a una enfermedad esquelética caracterizada por deformidades y/o malformaciones de los huesos. Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastornos de retardo de crecimiento esquelético producidos por fracturas de placa de crecimiento (fiseal), trastornos de retardo de crecimiento esquelético idiopáticos, o trastornos esqueléticos relacionados con FGFR3. En particular, un paciente que tiene un trastorno de retardo de crecimiento esquelético (por ejemplo, acondroplasia) puede tener huesos que son más cortos que los huesos de un paciente sano. Por ejemplo, el trastorno de retardo de crecimiento esquelético puede incluir una displasia esquelética, por ejemplo, acondroplasia, acondroplasia homocigota, acondroplasia heterocigota, acondrogénesis, acrodisostosis, displasia acromesomélica, atelosteogénesis, displasia camptomélica, condrodisplasia punctata, rizomelia tipo condrodisplasia punctata, disostosis cleidocranial, fémur corto congénito, craneosinostosis (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome de Pfeiffer o síndrome de Crouzonodermoesquelético), dactilia, braquidactilia, camptodactilia, polidactilia, sindactilia, displasia diastrófica, enanismo, displasia dissegmental,

encondromatosis, fibrocondrogénesis, displasia fibrosa,
 exostosis hereditaria múltiple, hipocondroplasia,
 hipofosfatasia, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de
 Jaffe-Lichtenstein, displasia de Kniest, síndrome de Kniest,
 5 displasia mesomélica de tipo Langer, síndrome de Marfan,
 síndrome de McCune-Albright, micromelia, displasia
 metafisaria, displasia metafisaria de tipo Jansen, displasia
 metatrófica, síndrome de Morquio, displasia mesomelica de
 tipo Nievergelt, neurofibromatosis, osteoartritis,
 10 osteocondrodisplasia, osteogénesis imperfecta, osteogénesis
 imperfecta de tipo letal perinatal, osteopetrosis,
 osteopoiquilosis, disostosis periférica, síndrome de
 Reinhard, síndrome de Robertt, síndrome de Robinow, síndromes
 de polidactilia de costillas cortas, baja estatura, displasia
 15 espondiloepifisaria congénita y displasia espondilo-
 epimetafisaria.

Los términos "receptor 3 de factor de crecimiento de
 fibroblastos soluble", "FGFR3 soluble" y "sFGFR3" se refieren
 a un FGFR3 que se caracteriza por la ausencia o interrupción
 20 funcional de todo o una parte sustancial del dominio
 transmembrana y cualquier porción de polipéptido que anclaría
 el polipéptido FGFR3 a una membrana celular (por ejemplo, un
 dominio tirosina quinasa). Un polipéptido sFGFR3 es una forma
 no unida a membrana de un polipéptido FGFR3. Por lo tanto, un
 25 polipéptido sFGFR3 puede incluir una delección de una porción

o todos los residuos de aminoácidos del dominio transmembrana de una secuencia de polipéptido FGFR3 de tipo salvaje (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8). El polipéptido sFGFR3 puede incluir además
 5 deleciones del dominio intracelular del polipéptido FGFR3 de tipo salvaje.

Polipéptidos de sFGFR3 de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, al menos aminoácidos 1 a 100, 1 a 125, 1 a 150, 1 a 175, 1 a 200, 1 a 205, 1 a 210, 1 a 215, 1 a
 10 220, 1 a 225, 1 a 230, 1 a 235, 1 a 240, 1 a 245, 1 a 250, 1 a 252, 1 a 255, 1 a 260, 1 a 265, 1 a 270, 1 a 275, 1 a 280, 1 a 285, 1 a 290, 1 a 295, o 1 a 300, o 1 a 301 de SEQ ID NO: 1-8. Polipéptidos sFGFR3 pueden incluir cualquier polipéptido que tiene al menos 50% (por ejemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,
 15 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) de identidad de secuencia a cualquiera de uno de estos polipéptidos sFGFR3 de SEQ ID NO: 1-8. Además, polipéptidos sFGFR3 de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, al menos aminoácidos 1 a 100, 1 a 125,
 20 1 a 150, 1 a 175, 1 a 200, 1 a 205, 1 a 210, 1 a 215, 1 a 220, 1 a 225, 1 a 230, 1 a 235, 1 a 240, 1 a 245, 1 a 250, 1 a 255, 1 a 260, 1 a 265, 1 a 270, 1 a 275, 1 a 280, 1 a 285, 1 a 290, 1 a 295, 1 a 300, 1 a 305, 1 a 310, 1 a 315, 1 a 320, 1 a 325, 1 a 330, 1 a 335, 1 a 340, 1 a 345, o 1 a 348
 25 de SEQ ID NO: 1-8. Polipéptidos sFGFR3 pueden incluir

cualquier polipéptido que tiene al menos 50% (por ejemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) de identidad de secuencia a cualquiera de estos polipéptidos sFGFR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-8). Cualquiera de los polipéptidos sFGFR3 anteriores o variantes de los mismos puede incluir opcionalmente un péptido señal en la posición de extremo N-terminal, tal como aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID NO: 21 (MGAPACALALCVAVAIVAGASS) o aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 43 (por ejemplo, MMSFVSLLLVGILFHATQA).

La frase "deposición de grasa subcutánea" se refiere a deposición de grasa en la hipodermis.

Por "tratar" y "tratamiento" se entiende una reducción (por ejemplo, por al menos aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 99% o incluso 100%) en deposición anormal de grasa o deposición anormal de grasa visceral, o en la progresión, severidad, o frecuencia de una o más o una condición asociada con la deposición anormal de grasa visceral (por ejemplo, enfermedad cardiovascular, enfermedad

pulmonar, enfermedad metabólica, o enfermedad neurológica) en un paciente (por ejemplo, un humano, tal como un feto, un neonato, un infante, un niño, un adolescente o un adulto). El tratamiento puede presentarse durante un período de

5 tratamiento, en el cual se administra un polipéptido sFGFR3 durante un período de tiempo (por ejemplo, días, meses, años, o más) para tratar un paciente (por ejemplo, un humano, como un feto, un neonato, un infante, un niño, un adolescente, o un adulto) que tiene deposición anormal de grasa, deposición

10 anormal de grasa visceral, o una condición asociada con deposición anormal de grasa visceral. Síntomas de ejemplo de deposición anormal de grasa visceral en un paciente con acondroplasia que se puede tratar con un sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o variante del mismo, tal como un

15 polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-7 o una variante del mismo) incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, hipertensión, disfunción de lípidos, apnea obstructiva del sueño, disfunción de glucosa o disfunción de insulina (por ejemplo, resistencia a la

20 insulina).

El término "formas de dosis unitaria" se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de material activo

25 calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en

asociación con cualquier excipiente, portador, o diluyente farmacéutico.

El término "variante", con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o una variante del mismo, con o sin un péptido señal) que difiere por uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos del polipéptido del cual se obtiene la variante (por ejemplo, el polipéptido de referencia, tal como, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7). El término "variante", con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere por uno o más cambios en la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido del cual se obtiene la variante (por ejemplo, el polinucleótido de referencia, tal como, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 que tiene la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de una de SEQ ID NO: 10-18). Los cambios en la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de la variante pueden ser, por ejemplo, sustituciones, inserciones, delecciones, truncamientos de extremo N-terminal, o truncamientos de extremo C de aminoácidos o ácido nucleico, o cualquier combinación de los mismos. En particular, las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras y/o no conservadoras. Una variante se puede caracterizar por identidad de secuencia de aminoácidos o

identidad de secuencia de ácido nucleico al polipéptido padre o polinucleótido de referencia, respectivamente. Por ejemplo, una variante puede incluir cualquier polipéptido que tiene al menos 50% (por ejemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,
5 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) de identidad de secuencia al polipéptido o polinucleótido de referencia.

Por "vector" se entiende una construcción de ADN que incluye uno o más polinucleótidos, o fragmentos de los
10 mismos, que codifican para un polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 o variante del mismo, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7, o una variante de la misma, con o sin un péptido de señal). El vector se puede
15 utilizar para infectar una célula (por ejemplo, una célula hospedadora o una célula de un paciente que tiene un trastorno de retardo de crecimiento esquelético humano, tal como acondroplasia), que da por resultado el traslado de los polinucleótidos del vector a un polipéptido sFGFR3. Un tipo
20 de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un
25 origen bacteriano de replicación y vectores episomales de

mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma
5 hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se ligan de forma operativa. En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes a menudo están en forma de plásmidos.

10 La frase "deposición de grasa visceral" se refiere a depósitos de grasa intraabdominales, que incluyen depósitos de grasa mesentéricos y omentales, retroperitoneales, y depósitos de grasa intratorácicos, que incluyen pericardiales.

15 La mención en la presente de intervalos numéricos por puntos finales se propone que incluya todos los números subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, una mención de 1 a 5 incluye 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, y 5).

Otras características y ventajas de la invención
20 serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve Descripción de las Figuras

El archivo de solicitud o patente contiene al menos una figura ejecutada en color. Copias de esta patente o
25 publicación de solicitud de patente con figuras a color se

proporcionarán por la oficina tras solicitud y pago de la tarifa necesaria.

Las figuras 1A hasta 1D son tablas, una imagen y gráficas que muestran que niños con acondroplasia desarrollan

5 obesidad abdominal sin un incremento en niveles de glucosa en sangre. La figura 1A es una tabla que muestra mediciones de peso, altura y IMC y puntuaciones z de altura a edad y IMC y edad en los tres grupos de edad que varían (n = 73 puntos de datos en el grupo de [0-3] años de edad, n = 61 puntos de

10 datos en el grupo de [4-8] años de edad y n = 36 puntos de datos en el grupo de [9-18] años de edad). Los resultados de análisis post hoc: a: significativamente diferente entre grupos [0-3] y [4-8]; b: significativamente diferente entre grupos [0-3] y [9-18]; c: significativamente diferente entre

15 grupos [4-8] y [9-18]. La figura 1B es una representación de imagen de las diferentes regiones de interés (ROI) evaluadas por DXA. La figura 1C es una gráfica que muestra medición de proporción de grasa androide:ginoide en los tres grupos de edad que varían (n = 4 puntos de datos en el grupo de [0-3] años de edad, n = 6 puntos de datos en el grupo de [4-8] años

20 de edad y n = 9 puntos de datos en el grupo [9-18] años de edad). La figura 1D es una gráfica que muestra concentración de glucosa plasmática en ayunas en los dos grupos de edad que varían de [4 y 8] y [9-18] años de edad (n = 16 puntos de

25 datos en el grupo de [4-8] años de edad y n = 12 puntos de

datos en el grupo de [9-18] años de edad). Las líneas horizontales representan valores normales. Se representan datos como media $\pm$ SD, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Las figuras 2A hasta 2H son gráficas e imágenes que muestran que ratones transgénicos *Fgfr3^{ach/+}* desarrollan de manera preferencial obesidad visceral que se impide tras el tratamiento de sFGFR3 (SEQ ID NO: 1). La figura 2A es una gráfica que muestra peso corporal de ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo y ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados con sFGFR3 después de 10 semanas de estímulo ND o HFD. La figura 2B son imágenes y una gráfica que muestra la relación grasa: magra abdominal. La figura 2C es una gráfica que muestra peso de tejido adiposo epididimal (eAT). La figura 2D es una gráfica que muestra peso de tejido adiposo subcutáneo (scAT) por gramo de peso corporal. La figura 2E es una gráfica que muestra área de adipocitos scAT. La figura 2F es una gráfica que muestra área de adipocitos eAT. La figura 2G es una gráfica que muestra dispersión scAT de adipocitos de acuerdo con su diámetro. Se presentan datos como media $\pm$ desviación estándar (n = 8-10 ratones a cada grupo). Los datos siguieron distribución normal. *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 versus WT tratado con vehículo, #p < 0.05, ##p < 0.01 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratado con vehículo; prueba t de Student. La figura 2H es una gráfica que muestra dispersión de eAT de adipocitos de acuerdo con su diámetro. Los datos se presentan como media

+/- desviación estándar (n = 8-10 ratones para cada grupo). Los datos siguieron distribución normal. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 versus WT tratados con vehículo, #p <0.05, ##p <0.01 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo; prueba t de Student.

Las figuras 3A y 3B son gráficas que muestran que las MSC aisladas de ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados con sFGFR3 o no tratados demuestran preacoplamiento hacia adipogénesis sin ninguna alteración de la respuesta a insulina en comparación con ratones WT. La figura 3A es una gráfica que muestra expresión de genes implicados en diferentes pasos de diferenciación de adipogénesis (genes listados en tabla 1). La expresión se normalizó a expresión HPRT, RPL6, y RPL13a y se expresó como porcentaje de cambio en comparación con WT.

La figura 3B son gráficas que muestran los resultados de las células estimuladas con 50 nM de insulina durante 0, 5, 15 o 30 min o con 0, 1, 10, 50 o 100 nM de insulina durante 5 min. La expresión P-Erk1/2, normalizada a expresión total Erk1/2, se expresó como valor normalizado a WT. Se representan datos como media $\pm$ SD. Los datos siguieron distribución normal. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 versus WT tratados con vehículo, #p <0.05, ##p <0.01 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo. ANOVA bidireccional con prueba múltiple de Tukey.

Las figuras 4A hasta 4F son gráficas e imágenes de microscopía que muestran que el metabolismo de glucosa se

altera en ratones transgénicos *Fgfr3^{ach/+}* y se restaura con tratamiento de sFGFR3. La figura 4A es una gráfica que muestra glucemia e insulinemia en ayunas de ratones después de 10 semanas de ND. La figura 4B es una gráfica que muestra glucemia e insulinemia en ayunas de ratones después de 10 semanas de HFD. La figura 4C muestra gráficas de los resultados de una prueba de tolerancia a glucosa HFD; se normalizaron niveles de glucosa al valor de tiempo -15 min y área bajo la curva que corresponde a cada grupo de ratones.

La figura 4D muestra primero microscopía de contenido de insulina de páncreas de ratones (inmunohistoquímica de secciones incrustadas en parafina, rojo: insulina; verde: glucosa; azul: tinción DAPI). La figura 4D también muestra una gráfica de contenido de insulina de páncreas de ratones, media de islotes pancreáticos normalizada a superficie total y media de número de islotes en cada grupo bajo una condición HFD. La figura 4E muestra microscopía de tinción H&E y PAS de hígado bajo condición HFD. La figura 4F muestra microscopía de tinción H&E de nódulos hepáticos. Se representan datos como media $\pm$ SD (n = 8-10 ratones para cada grupo). Los datos siguieron distribución normal. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus WT tratados con vehículo, #p < 0.05, ##p < 0.01 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo; prueba t de Student.

Las figuras 5A hasta 5D son gráficas que muestran que los ratones transgénicos *Fgfr3^{ach/+}* no tratados extraen

esencialmente toda su energía de lípidos. La figura 5A muestra cociente respiratorio basal ($RQ = VCO_2/VO_2$) durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación después de 10 semanas de estímulo ND. La figura 5B muestra oxidación de lípidos y carbohidratos basal en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con ND. La figura 5C muestra cociente respiratorio basal ($RQ = VCO_2/VO_2$) durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación después de 10 semanas de estímulo HFD. La figura 5D muestra oxidación de lípidos y carbohidratos basal en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con HFD. Se representan datos como media $\pm$ SE (n = 8-10 ratones para cada grupo). Los datos siguieron distribución normal. **p <0.01, ***p <0.001 versus WT tratados con vehículo, #p <0.05, ##p <0.01 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo; prueba t de Student.

Las figuras 6A y 6B son gráficas que muestran adipocinas circulantes estudiadas en el suero de ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados y tratados con sFGFR3. La figura 6A es una gráfica que muestra resultados de ratones estimulados con una ND. La figura 6B es una gráfica que muestra resultados de ratones estimulados con un HFD. Se expresaron resultados como porcentaje de cambio en comparación con WT. AgRP, proteína agoutirelada; ANGPT-L3, angiopoyetina-3; PCR, proteína C reactiva; DPPIV, dipeptidil peptidasa V; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; HGF, factor de crecimiento de

hepatocitos; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1; IGF, factor de crecimiento similar a insulina; IGFBP, proteína de unión de factor de crecimiento similar a insulina; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos-1; M-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos; Pref-1, factor de preadipocito 1; RAGE, receptor para productos finales de glicación avanzada; RANTES, receptor tras activación, células T normales expresadas y secretadas; RBP4, proteína de unión a retinol; TIMP-1, inhibidor de tejido de metaloproteinasas; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

Las figuras 7A hasta 7H son gráficas que muestran que ratones transgénicos con acondroplasia mostraron gasto energético normal, actividad acumulativa y crianza acumulativa durante calorimetría indirecta. La figura 7A muestra consumo de oxígeno basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con ND. La figura 7B muestra producción de dióxido de carbono basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con ND. La figura 7C muestra gasto energético basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación para ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con ND. La figura 7D muestra crianza y actividad acumulativa basal en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con ND. La figura 7E muestra consumo de

oxígeno basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con HFD. La figura 7F muestra producción de dióxido de carbono basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con HFD. La figura 7G muestra gasto energético basal durante ayuno nocturno o diurno y períodos de alimentación en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con HFD. La figura 7H muestra crianza y actividad acumulativa basal en ratones WT y *Fgfr3^{ach/+}* estimulados con HFD. Se representan datos como media $\pm$ SE (n = 8-10 ratones para cada grupo). Los datos siguieron distribución normal. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus WT tratados con vehículo, ###p < 0.001 versus *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo; prueba t de Student.

Descripción Detallada de la Invención

Hemos descubierto que los polipéptidos de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos soluble (sFGFR3) y polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3, y variantes de los mismos, se pueden utilizar para tratar deposición anormal de grasa visceral en un paciente (por ejemplo, un humano, particularmente un feto, un neonato, un niño, un adolescente, y un adulto) en necesidad del mismo. En particular, polipéptidos sFGFR3 que se pueden utilizar en los métodos de tratamiento descritos en la presente incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos de

cualquiera de una de SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma que tienen al menos 85% de identidad de secuencia a las mismas. Polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR o células que contienen los polinucleótidos también se
5 pueden administrar en los métodos de tratamiento.

Métodos de tratamiento

Se proporcionan en la presente métodos para tratar a un paciente con deposición anormal de grasa visceral y las condiciones asociadas con deposición anormal de grasa
10 visceral. En particular, el paciente puede tener un índice elevado de masa corporal, diámetro sagital, proporción de grasa androide:ginoide, índice de masa grasa, y área de grasa visceral. El paciente también puede tener un síndrome de retardo de crecimiento esquelético, por ejemplo,
15 acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa con retraso de desarrollo y acantosis nigricans (SADDAN), hipocondroplasia, y síndromes de craneosinostosis (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, y síndrome
20 de Crouzonodermoesquelético, síndrome de camptodactilia, estatura alta, y pérdida auditiva (CATSHL). Puede ser el caso que el paciente tenga un síndrome de retardo de crecimiento esquelético y una condición asociada con deposición anormal de grasa visceral (por ejemplo, aterosclerosis, hipertensión,
25 infarto de miocardio, dislipidemia, apnea del sueño,

enfermedad pulmonar restrictiva, asma, demencia, disfunción de insulina (por ejemplo, resistencia a la insulina), disfunción de metabolismo de glucosa, infertilidad, irregularidades menstruales, accidente cerebrovascular, y

5 demencia.

Alternativamente, el paciente puede ser uno que no tiene un síndrome de retraso de crecimiento esquelético, pero tiene una afección que conduce a una deposición anormal de grasa visceral (por ejemplo, obesidad, síndrome de ovario

10 poliquístico e hipercortisolismo (por ejemplo, enfermedad de Cushing)). Por ejemplo, el paciente puede tener una deposición anormal de grasa visceral y una afección asociada con una deposición anormal de grasa visceral (por ejemplo, aterosclerosis, hipertensión, infarto de miocardio,

15 dislipidemia, apnea del sueño, enfermedad pulmonar restrictiva, asma, demencia, disfunción de insulina (por ejemplo, Insulina resistencia), disfunción de metabolismo de la glucosa, infertilidad, irregularidades menstruales, accidente cerebrovascular y demencia). El método también

20 puede implicar administración de un sFGFR3 para tratar a un paciente con señalización aberrante de FGF10, como un paciente con enfermedad de Cushing causada por disfunción de glándula pituitaria.

El paciente también puede caracterizarse por tener

25 una deposición de grasa visceral asociada con o alrededor de

uno o más de los siguientes órganos: corazón, hígado, bazo, riñones, páncreas, intestinos, órganos reproductivos y vesícula biliar.

El método implica administrar un polipéptido sFGFR3 de la invención, por ejemplo, aquellos descritos en la presente, al paciente que tiene una deposición anormal de grasa visceral. El paciente puede ser un feto, un recién nacido, un bebé, un niño, un adolescente o un adulto en riesgo de desarrollar una deposición anormal de grasa abdominal. La paciente también puede tener un síndrome de retraso de crecimiento esquelético (por ejemplo, acondroplasia), obesidad, hipercortisolismo (por ejemplo, enfermedad de Cushing) o síndrome de ovario poliquístico. El paciente (por ejemplo, un humano) se puede tratar antes de que se desarrollen signos y síntomas de deposición anormal de grasa visceral. En particular, los pacientes que pueden tratarse con un polipéptido sFGFR3 de la invención descrita en la presente son aquellos que presentan síntomas que incluyen, pero no se limitan a, índice de masa grasa anormal, área anormal de grasa visceral, IMC elevado, circunferencia de cintura elevada, diámetro sagital aumentado, y proporción de grasa androide:ginoide. Además, los pacientes que se pueden tratar con un polipéptido sFGFR3 tienen una distribución anormal de grasa visceral y condiciones asociadas con la deposición anormal de grasa visceral (por

ejemplo, enfermedades metabólicas, cardiovasculares, pulmonares, reproductivas o neurológicas). Además, el tratamiento con un polipéptido sFGFR3 puede dar como resultado una mejora en uno o más de los síntomas mencionados

5 anteriormente relacionados con deposición anormal de grasa visceral (por ejemplo, en relación con un paciente no tratado). Al paciente (por ejemplo, un humano) se le puede diagnosticar una deposición anormal de grasa visceral, como uno con síndrome de retraso de crecimiento esquelético (por

10 ejemplo, acondroplasia), obesidad, hipercortisolismo (por ejemplo, enfermedad de Cushing) y síndrome de ovario poliquístico, antes de la administración de un polipéptido sFGFR3. Además, el paciente que tiene una deposición anormal de grasa visceral puede ser uno que no haya sido tratado

15 previamente con un polipéptido sFGFR3.

Un paciente que se puede tratar con un polipéptido sFGFR3 también incluye un paciente con diabetes o en riesgo de desarrollar diabetes, como un paciente obeso. El tratamiento de este paciente puede implicar administración

20 local del FGFR3 soluble al páncreas para tratar o prevenir desarrollo de diabetes.

Polipéptidos de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos soluble (sFGFR3)

Los polipéptidos FGFR3 solubles y sus variantes se

25 pueden usar en los métodos de tratamiento de un paciente que

tiene una deposición anormal de grasa visceral. El polipéptido sFGFR3 puede incluir al menos 50 aminoácidos consecutivos de un dominio extracelular (ECD) de un polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) presente de manera natural (por ejemplo, el polipéptido FGFR3 que tiene la secuencia establecida en el número de acceso en Genbank NP_000133; ver también SEQ ID NO: 8). En particular, el polipéptido sFGFR3 puede incluir 100-370 aminoácidos consecutivos (por ejemplo, menos de 350 aminoácidos consecutivos) de un ECD de un polipéptido de receptor 3 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) presente de manera natural. El polipéptido sFGFR3 también puede tener un dominio tipo C2 y tipo Ig 1, 2 y/o 3 de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural.

El polipéptido sFGFR3 puede tener, o puede carecer, de un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de un polipéptido FGFR3, tal como el correspondiente a SEQ ID NO: 21; en particular, el sFGFR3 es un polipéptido maduro que carece del péptido señal, que se escinde durante expresión y secreción de la célula). El polipéptido sFGFR3 también carece de un dominio transmembrana (TM), como la TM de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural.

Los polipéptidos sFGFR3 también pueden contener todo o una porción de un dominio intracelular (ICD) de un polipéptido FGFR3. Por ejemplo, el polipéptido sFGFR3 puede

tener 400 aminoácidos consecutivos o menos (por ejemplo, entre 5 y 399 aminoácidos consecutivos, como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15 o menos consecutivos aminoácidos) de un ICD de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural.

5 El ICD del polipéptido sFGFR3 también puede carecer de un dominio tirosina quinasa de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural. Alternativamente, el polipéptido sFGFR3 puede carecer de cualquier aminoácido de un ICD de un polipéptido FGFR3 presente de manera natural (por ejemplo, el polipéptido
10 FGFR3 de la SEQ ID NO: 8).

El polipéptido sFGFR3 también puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, 92%, 95%, 97% o 99% de identidad de secuencia, o la secuencia de aminoácidos 401 a 413 de SEQ ID NO: 8.

15 Un polipéptido sFGFR3 para uso en los métodos descritos en la presente puede tener menos de 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150 o 100 aminoácidos de longitud y/o puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86% -100%
20 de identidad de secuencia, como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) a los residuos de aminoácidos 1 a 280 de la SEQ ID NO: 8. El polipéptido sFGFR también puede ser uno con una secuencia de aminoácidos que tenga al menos 85% de identidad
25 de secuencia (por ejemplo, 86% -100% de identidad de

secuencia, como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7. En particular, el sFGFR3 tiene la secuencia de aminoácidos de

5 SEQ ID NO: 5 o 6 (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5). El polipéptido sFGFR3 también puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 6, excepto que el residuo en la posición 253 es una alanina, glicina, prolina o treonina.

Variantes del polipéptido sFGFR3 que se pueden

10 administrar en los métodos también incluyen fragmentos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8 (por ejemplo, al menos los aminoácidos 1 a 200, 1 a 205, 1 a 210, 1 a 215, 1 a 220, 1 a 225, 1 a 235, 1 a 230, 1 a 240, 1 a 245, 1 a 250, 1 a 253, 1 a 255, 1 a 260, 1 a 265, 1 a 275,

15 1 a 280, 1 a 285, 1 a 290, o 1 a 300, de SEQ ID NO: 8) o polipéptidos que tienen al menos 50% de identidad de secuencia (por ejemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% , 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de secuencia) a cualquiera de las

20 SEQ ID NO: 1-8 (y que, por ejemplo, carecen de péptido señal y dominio TM).

Los polipéptidos sFGFR3 de la invención también se pueden caracterizar por unirse a un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). En particular, el FGF se selecciona del

25 grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos 1

(FGF1; SEQ ID NO: 26), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2; SEQ ID NO: 27), factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF9; SEQ ID NO : 28), hecho de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10; SEQ ID NO: 40), factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF18; SEQ ID NO: 29), factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19; SEQ ID NO: 30), factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21; SEQ ID NO: 31) y factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23; SEQ ID NO: 41). La unión se caracteriza por una constante de disociación de equilibrio (Kd) de aproximadamente 0.2 nM a aproximadamente 20 nM (por ejemplo, un Kd de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM, en donde opcionalmente la Kd es de aproximadamente 1 nm, aproximadamente 2 nm, aproximadamente 3 nm, aproximadamente 4 nm, aproximadamente 5 nm, aproximadamente 6 nm, aproximadamente 7 nm, aproximadamente 8 nm, aproximadamente 9 nm o aproximadamente 10 nm).

Dados los resultados descritos en la presente, la invención no se limita a un polipéptido sFGFR3 particular o una variante del mismo. Además de los polipéptidos sFGFR3 de ejemplo y las variantes de los mismos analizados anteriormente, cualquier polipéptido de sFGFR3 que se una a uno o más FGF con una afinidad de unión similar a los polipéptidos sFGFR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-7 también se considera útil para tratar

deposición anormal de grasa visceral en un sujeto que lo necesita. Los polipéptidos sFGFR3 pueden ser, por ejemplo, fragmentos de la isoforma 2 de FGFR3 que carecen de exones 8 y 9 que codifican para la mitad de extremo C-terminal del dominio IgG3 y exón 10 que incluye el dominio transmembrana (por ejemplo, fragmentos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8), correspondiente a fragmentos de la variante de transcripción de FGFR3 2 (número de acceso NM_022965).

Como se indicó anteriormente, un polipéptido sFGFR3 para uso en los métodos de la invención puede incluir un péptido señal en la posición N-terminal. Un péptido señal de ejemplo puede incluir, pero sin limitación, aminoácidos 1 a 22 de la SEQ ID NO: 21 (por ejemplo, mGAPACALALCVAVAIVAGASS). Por consiguiente, los polipéptidos sFGFR3 incluyen tanto formas secretadas, que carecen del péptido señal N-terminal, como formas no secretadas, que incluyen el péptido señal N-terminal. Por ejemplo, un polipéptido sFGFR3 secretado puede incluir la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7, pero sin un péptido señal N-terminal (por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO: 21). Alternativamente, el polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7) incluye un péptido señal, tal como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. Un experto en el la técnica apreciará que la posición del péptido señal N-terminal

variará en diferentes polipéptidos sFGFR3 y puede incluir, por ejemplo, los primeros 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 30 o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal del polipéptido. Un
5 experto en la materia puede predecir la posición de un sitio de escisión de secuencia de señal, por ejemplo, mediante un algoritmo informático apropiado tal como aquel descrito en Bendtsen et al. (J. Mol. Biol. 340 (4): 783-795, 2004) y disponible en la Web en cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

10 Además, los polipéptidos sFGFR3 de la invención pueden estar glicosilados. En particular, un polipéptido sFGFR3 puede alterarse para aumentar o disminuir el grado al que se glicosila el polipéptido sFGFR3. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un polipéptido
15 sFGFR3 se puede lograr alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o eliminen uno o más sitios de glicosilación. Por ejemplo, la glicosilación ligada a N, en la que un oligosacárido se une al nitrógeno de la amida de un residuo de asparagina, puede presentarse en la posición
20 Asn76, Asn148, Asn169, Asn 203, Asn240, Asn272 y/o Asn 294 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 6 y sus variantes. Uno o más de estos residuos de Asn también se pueden sustituir para eliminar el sitio de glicosilación. Por ejemplo, la glicosilación ligada a O, en la que un
25 oligosacárido se une a un átomo de oxígeno de un residuo de

aminoácido, puede presentarse en la posición Ser109, Thr126, Ser199, Ser274, Thr281, Ser298, Ser299 y/o Thr301 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 6 y sus variantes. Además, la glicosilación ligada a O puede presentarse en un

5 residuo de serina dentro del sFGFR3. Uno o más de estos residuos Ser o Thr también se pueden sustituir para eliminar el sitio de glicosilación.

Polipéptidos sFGFR3 de fusión

Los polipéptidos sFGFR3 de la invención (por ejemplo,

10 polipéptidos sFGFR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 o una variante de las mismos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con los mismos (por ejemplo, 86% -100% de identidad de secuencia, tal como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

15 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) pueden fusionarse a un dominio funcional de un polipéptido heterólogo (por ejemplo, un fragmento de región cristalizable (región Fc; tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y 36) o albúmina de suero humana (HSA; como un

20 polipéptido que tiene el secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37)) para proporcionar un polipéptido de fusión sFGFR3. Opcionalmente, se puede incluir un ligador flexible entre el polipéptido sFGFR3 y el polipéptido heterólogo (por ejemplo, una región Fc o HSA), tal como una serina o secuencia rica en

25 glicina (por ejemplo, un ligador de poliglicina o

poliglicina/serina, tal como las SEQ ID NO: 38 y 39).

Por ejemplo, los polipéptidos sFGFR3 y sus variantes pueden ser un polipéptido de fusión que incluye, por ejemplo, una región Fc de una inmunoglobulina en el dominio N-terminal o C-terminal. En particular, las regiones Fc útiles pueden incluir el fragmento Fc de cualquier molécula de inmunoglobulina, que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD o IgE y sus diversas subclases (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1, IgA-2) de cualquier mamífero (por ejemplo, un humano). Por ejemplo, el fragmento Fc IgG-1 humana (SEQ ID NO: 35) o una variante de IgG-1 humana, tal como una variante que incluye una sustitución de asparagina en la posición 297 de SEQ ID NO: 35 con alanina (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36). Los fragmentos Fc de la invención pueden incluir, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada y cualquier porción de la región bisagra. Los polipéptidos sFGFR3 de fusión de la invención también pueden incluir, por ejemplo, un Fc monomérico, tal como un dominio CH2 o CH3. La región Fc puede estar glicosilada opcionalmente en cualquiera de los residuos de aminoácidos apropiados conocidos por los expertos en la técnica. Un fragmento Fc como se describe en la presente puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más adiciones, delecciones o sustituciones con respecto a

cualquiera de los fragmentos Fc descritos en la presente.

Además, los polipéptidos sFGFR3 se pueden conjugar con otras moléculas en el dominio N-terminal o C-terminal con el fin de mejorar la solubilidad y la estabilidad de la proteína en solución acuosa. Ejemplos de estas moléculas incluyen albúmina de suero humana (HSA), PEG, PSA y albúmina de suero bovina (BSA). Por ejemplo, los polipéptidos sFGFR3 pueden conjugarse con HSA humana (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37) o un fragmento de los mismos.

Los polipéptidos sFGFR3 de fusión pueden incluir una región de enlace peptídico entre el polipéptido sFGFR3 y el polipéptido heterólogo (por ejemplo, una región Fc o HSA). La región de enlace puede ser de cualquier secuencia y longitud que permita que el sFGFR3 permanezca biológicamente activo, por ejemplo, sin impedimento estérico. Las longitudes de enlace de ejemplo son entre 1 y 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 1-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, o 191-200 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, los ligadores incluyen o consisten en porciones flexibles, por ejemplo, regiones sin una estructura secundaria o terciaria fija significativa. Intervalos preferidos son de 5 a 25 y de 10 a

20 aminoácidos de longitud. Esta flexibilidad generalmente aumenta si los aminoácidos son pequeños y no tienen cadenas laterales voluminosas que impiden la rotación o la flexión de la cadena de aminoácidos. Por lo tanto, preferiblemente el

5 ligador peptídico de la presente invención tiene un contenido incrementado de aminoácidos pequeños, en particular de glicinas, alaninas, serinas, treoninas, leucinas e isoleucinas.

Ligadores flexibles de ejemplo son ligadores ricos en

10 glicina, por ejemplo, que contienen al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso 100% de residuos de glicina. Los ligadores también pueden contener, por ejemplo, ligadores ricos en serina, por ejemplo, que contienen al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso

15 100% de residuos de serina . En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de un ligador consiste solo en residuos de glicina y serina. Por ejemplo, el ligador puede ser la secuencia de aminoácidos de GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 38) o GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39). Un ligador puede

20 opcionalmente estar glicosilado en cualquiera de los residuos de aminoácidos apropiados. El ligador también puede estar ausente, en el que el polipéptido sFGFR3 y el polipéptido heterólogo (por ejemplo, una región Fc o HSA) se fusionan directamente, sin residuos intermedios.

25 **Polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3**

Polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3 se pueden usar para tratar a un paciente que tiene una deposición anormal de grasa visceral en un paciente (por ejemplo, un ser humano, como un feto, un recién nacido, un

5 bebé, un niño, un adolescente o un adulto). Por ejemplo, el polinucleótido puede tener la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 10-18 o una variante del mismo que tenga al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% , 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

10 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia) a la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 10-18. Además, el polinucleótido puede tener la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o 15 o una variante que tenga al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86%,

15 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia) a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o 15.

También se presentan polinucleótidos que codifican para polipéptidos sFGFR3 de fusión (por ejemplo, un

20 polipéptido sFGFR3 fusionado a un polipéptido heterólogo, tal como una región Fc o HSA) y polinucleótidos que codifican para polipéptidos sFGFR3 sin un péptido señal (por ejemplo, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-7) o con un péptido señal (por

25 ejemplo, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos

de cualquiera de SEQ ID NO: 1-7. Además, los polinucleótidos pueden tener una o más mutaciones para alterar cualquiera de los sitios de glicosilación descritos en la presente o que se sabe que están presentes en el polipéptido.

5 Opcionalmente, los polinucleótidos de la invención pueden optimizarse con codones para alterar los codones en el ácido nucleico, en particular para reflejar uso típico de codones del organismo hospedador (por ejemplo, un humano) sin alterar el polipéptido sFGFR3 codificado por la secuencia de
10 ácido nucleico del polinucleótido. Los polinucleótidos optimizados con codones (por ejemplo, un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o 16) pueden, por ejemplo, facilitar manipulaciones genéticas al disminuir el contenido de GC y/o para la expresión en una
15 célula hospedadora (por ejemplo, una célula HEK 293 o una célula CHO). La optimización de codones se puede realizar por una persona experta, por ejemplo mediante el uso de herramientas en línea tal como JAVA Codon Adaption Tool (www.jcat.de) o Integrated DNA Technologies Tool
20 (www.eu.idtdna.com/CodonOpt) simplemente ingresando la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido y el organismo hospedador para el cual se van a optimizar los codones. El uso de codones de diferentes organismos está disponible en bases de datos en línea, por ejemplo, www.kazusa.or.jp/codon.

25 **Células hospedadoras para expresión de los polipéptidos**

sFGFR3

Células de mamífero pueden usarse como células hospedadoras para la expresión del polipéptido sFGFR3 (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma). Ejemplos de tipos de células de mamífero útiles en los métodos incluyen, pero no se limitan a, células de riñón embrionario humano (HEK; por ejemplo, HEK 293), células de ovario de hámster chino (CHO), células L, células C127, células 3T3, células BHK, COS -7 células, células HeLa, células PC3, células Vero, células MC3T3, células NS0, células Sp2/0, células MUY, BHK, células MDCK, células W138, células BT483, células Hs578T, células HTB2, células BT20, células T47D, Células NS0, células CRL7030 y células HsS78Bst, o cualquier otra célula hospedadora de mamífero adecuada conocida en la técnica. Alternativamente, las células de E. coli pueden usarse como células hospedadoras para la expresión de los polipéptidos sFGFR3. Los ejemplos de cepas de E. coli incluyen, entre otros, E. coli 294 (ATCC® 31,446), E. coli λ 1776 (ATCC® 31,537, E. coli BL21 (DE3) (ATCC® BAA-1025), E. coli RV308 (ATCC® 31,608), o cualquier otra cepa adecuada de E. coli conocida en la técnica.

Vectores que incluyen polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3

También se presentan vectores recombinantes que incluyen cualquiera de uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente (por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y sus variantes). Los vectores de la invención se pueden usar para administrar un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 de la invención y variantes de la misma, que pueden incluir vectores de expresión de mamíferos, virus y bacterias. Por ejemplo, los vectores pueden ser plásmidos, cromosomas artificiales (por ejemplo, bAG, PAC e YAC) y vectores de virus o fagos, y pueden incluir opcionalmente un promotor, potenciador o regulador para la expresión del polinucleótido. Los vectores también pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tal como un gen de resistencia a ampicilina, neomicina y/o kanamicina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para un vector fúngico. Los vectores pueden usarse in vitro para la producción de ADN o ARN o usarse para transfectar o transformar una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora de mamífero para la producción de un polipéptido sFGFR3 codificado por el vector. Los vectores también pueden adaptarse para usarse in vivo en un método de terapia génica.

Vectores virales de ejemplo que se pueden usar para administrar un polinucleótido que codifica para un

polipéptido sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) incluyen un retrovirus, adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50 y Pan9 (también conocido como AdC68)), parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de hebra negativa tal como el ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de hebra positiva, tal como el picornavirus y el alfavirus, y virus de ADN bicatenario que incluyen adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus Herpes Simplex tipo 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, vaccinia Ankara modificado (MVA), viruela aviar y viruela del canario). Otros virus útiles para administrar polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3 incluyen el virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis. Ejemplos de retrovirus incluyen leucosis-sarcoma aviar, virus tipo C de mamífero, virus tipo B, virus tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus y spumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Tercera edición, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996).

Métodos de producción

Los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se genera un polinucleótido utilizando métodos de clonación molecular y se coloca dentro de un vector, tal como un plásmido, un cromosoma artificial, un vector viral o un vector de fago. El vector se usa para transformar el polinucleótido en una célula hospedadora apropiada para la expresión del polipéptido sFGFR3.

Construcción de vector de ácido nucleico y células hospedadoras

Los polipéptidos sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) se pueden producir a partir de una célula hospedadora. Los polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos que tienen la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 14 o 16 y sus variantes) que codifican para los polipéptidos sFGFR3 pueden incluirse en vectores que pueden introducirse en la célula hospedadora mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio,

microinyección directa o infección). La elección del vector depende en parte de las células hospedadoras que se van a utilizar. Generalmente, las células hospedadoras son de origen procariota (por ejemplo, bacteriana) o eucariota (por
5 ejemplo, de mamífero).

Un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) puede prepararse mediante una
10 variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, entre otros, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio) y mutagénesis por PCR. Se puede obtener un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 usando técnicas estándar, por ejemplo,
15 síntesis génica. Alternativamente, un polinucleótido que codifica para un polipéptido sFGFR3 de tipo salvaje (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8) puede mutarse para contener sustituciones de aminoácidos específicas usando técnicas estándar en la
20 técnica, por ejemplo, mutagénesis QuikChange^{MR}. Los polinucleótidos que codifican para un polipéptido sFGFR3 se pueden sintetizar usando, por ejemplo, un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR.

Polinucleótidos que codifican para el polipéptido
25 sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene

la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) se pueden insertar en un vector capaz de replicar y expresar el polinucleótido en células hospedadoras procariotas o eucariotas. Ejemplos de
5 vectores útiles en los métodos pueden incluir, pero no se limitan a, un plásmido, un cromosoma artificial, un vector viral y un vector de fago. Por ejemplo, un vector viral puede incluir los vectores virales descritos anteriormente, tal como un vector retroviral, un vector adenoviral o un vector
10 poxviral (por ejemplo, un vector viral vaccinia, tal como Vaccinia Ankara Modificada (MVA)), un vector viral adenoasociado y vector alfaviral)) que contiene la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3. Cada vector puede contener varios
15 componentes que pueden ajustarse y optimizarse para compatibilidad con la célula hospedadora particular. Por ejemplo, los componentes del vector pueden incluir, entre otros, un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, una
20 secuencia señal, la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 y/o una secuencia de terminación de transcripción.

Los vectores descritos anteriormente pueden introducirse en células hospedadoras apropiadas (por ejemplo,
25 células HEK 293 o células CHO, o en una célula hospedadora de

un sujeto) usando técnicas convencionales en la técnica, por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, y microinyección directa. Una vez que los vectores se introducen en las células

5 hospedadoras para producción de un polipéptido sFGFR3 de la invención, las células hospedadoras se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o

10 amplificar los polinucleótidos que codifican para el polipéptido sFGFR3. Métodos para expresión de proteínas terapéuticas, tal como los polipéptidos sFGFR3, se conocen en la técnica, ver, por ejemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press' 2da. Edición,

15 2004 (Julio 20, 2004) y Vladimir Voynov y Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press' 2da. Edición, 2012 (Junio 28, 2012), cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

20 **Producción, recuperación y purificación de polipéptido sFGFR3**

Las células hospedadoras (por ejemplo, células HEK 293 o células CHO) utilizadas para producir el polipéptido sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:

25 1-7 y variantes de la misma) se pueden cultivar en medios

conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados para células hospedadoras de mamífero incluyen Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), Medio de Expresión Expi293^{MR}, DMEM 5 suplementado con suero bovino fetal (FBS) y RPMI-1640. Ejemplos de medios adecuados para las células hospedadoras bacterianas incluyen caldo Luria (LB) más suplementos necesarios, tal como un agente de selección, por ejemplo, 10 ampicilina. Las células hospedadoras se cultivan a temperaturas adecuadas, tal como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, por ejemplo, de 25 °C a aproximadamente 37 °C, preferiblemente 37 °C, y niveles de CO₂, tal como 5 a 10% (preferiblemente 8%). El pH del medio 15 es generalmente de aproximadamente 6.8 a 7.4, por ejemplo, 7.0, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, la expresión del polipéptido sFGFR3 se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor.

20 Un polipéptido sFGFR3 de la invención (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) puede recuperarse del sobrenadante de la célula hospedadora. Alternativamente, el polipéptido sFGFR3 se puede recuperar al 25 alterar la célula hospedadora (por ejemplo, usando choque

osmótico, sonicación o lisis), seguido de centrifugación o filtración para eliminar el polipéptido sFGFR3. Tras la recuperación del polipéptido sFGFR3, el polipéptido sFGFR3 puede luego purificarse adicionalmente. Un polipéptido sFGFR3
5 se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica de purificación de proteínas, tal como afinidad de proteína A, otra cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad y exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por
10 cualquier otra técnica estándar para purificación de proteínas (ver, *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009 incorporada en la presente como referencia en su totalidad).

Opcionalmente, el polipéptido sFGFR3 de la invención
15 (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 y variantes de la misma) se puede conjugar a una etiqueta detectable para purificación. Los ejemplos de etiquetas adecuadas para uso en la purificación de los polipéptidos
20 sFGFR3 incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta de proteína, un fluoróforo, un cromóforo, un radiomarcador, un coloide metálico, una enzima o una molécula quimioluminiscente o bioluminiscente. En particular, las etiquetas de proteínas que son útiles para la purificación de
25 los polipéptidos sFGFR3 pueden incluir, pero no se limitan a,

etiquetas de cromatografía (por ejemplo, etiquetas de péptidos que consisten de aminoácidos polianiónicos, tal como una etiqueta FLAG o una etiqueta de hemaglutinina "HA"), etiquetas de afinidad (por ejemplo, una etiqueta de poli
 5 (His), proteína de unión a quitina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP) o glutatión-S-transferasa (GST)), etiquetas de solubilización (por ejemplo, tiorredoxina (TRX) y poli (NANP)), etiquetas de epítipo (por ejemplo, etiqueta V5, etiqueta Myc y etiqueta HA) o etiquetas de fluorescencia (por
 10 ejemplo, gFP, variantes de GFP, RFP y variantes de RFP).

Métodos de diagnóstico

Se puede identificar que un paciente con deposición anormal de grasa visceral necesita tratamiento mediante una de las muchas técnicas conocidas en la técnica. Hay dos
 15 categorías de técnicas: técnicas antropométricas e imágenes. Las técnicas antropométricas se basan en mediciones basadas en cinta métrica y báscula. Las técnicas de imagen se basan en atenuación de rayos de rayos X a medida que viajan a través de un paciente o en las propiedades magnéticas de los
 20 núcleos de hidrógeno de un paciente.

Una técnica antropométrica comúnmente utilizada que clasifica a los pacientes como peso normal, sobrepeso u obesidad es el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula dividiendo el peso del paciente (en kg) por el
 25 cuadrado de la altura del paciente (en m). El límite que

indica obesidad en adultos es diferente de los umbrales en niños. Para los adultos, se considera que está presente obesidad cuando el IMC es de 30 kg/m² o más (ver, por ejemplo, Nuttall, Nutr. Today 50 (3): 117-28, 2015); para los
5 niños, el umbral para la obesidad varía según la edad y la altura (ver, por ejemplo, van der Sluis et al., Arch. Dis. Child. 87 (4): 341-347, 2002). Las tablas estándar para el IMC en niños tienen limitaciones cuando se consideran niños acondroplásicos (ver, por ejemplo, Hoover-Fong et al., Am. J. Clin. Nutr. 88, 364-371, 2008).

Entre las técnicas antropométricas, el IMC no distingue entre la deposición de grasa subcutánea y visceral. Como resultado, la grasa visceral abdominal anormal se identifica mejor utilizando la circunferencia de la cintura
15 (medida justo por encima de la parte superior palpada del hueso de la cresta ilíaca), el diámetro sagital (la distancia anteroposterior de la parte inferior de la espalda hasta el abdomen anterior) y la proporción de grasa androide:ginoide (la circunferencia de la cintura dividida por la
20 circunferencia de la cadera).

El límite para circunferencia anormal de cintura es, para mujeres adultas, mayores de 83 cm, y para hombres adultos mayores de 90 cm (ver, por ejemplo, Zhu et al., Am. J. Clin. Nutr. 76 (4): 743- 749, 2002). Para diámetros
25 sagitales, el límite para mujeres es mayor de 20.1 cm y para

hombres, mayor de 23.1 cm; ver, por ejemplo, Pimentel y col., Nutr. Hosp. 25 (4): 656-61, 2010. Finalmente, para la proporción de grasa androide:ginoide, el límite para mujeres es mayor que 0.85, mientras que para hombres es mayor que 0.9; ver, por ejemplo, Price et al, Am. J. Clin. Nutr. 84 (2): 449-460, 2006).

Una técnica de imagenología que se basa en rayos X es la absorciometría con rayos X de doble energía (DXA), un método en el que se utilizan dos haces de rayos X de energía diferente para determinar la masa de grasa (en lugar de magra), y a partir de esta determinación, se obtiene una medida llamada índice de masa grasa (masa grasa medida dividida por el cuadrado de la altura). El límite para la deposición anormal de grasa en mujeres es mayor que 13, y el límite para la deposición anormal de grasa en hombres es mayor que 9; ver, por ejemplo Kelly et al, PLOS One, 4 (9): 2009).

Tanto la tomografía computarizada (mediante rayos X) como la resonancia magnética (dependiendo las propiedades magnéticas del cuerpo) pueden obtener imágenes del abdomen en sección transversal y, por lo tanto, distinguir la deposición de grasa visceral de la subcutánea. Con CT o MRI, el límite para la deposición anormal de grasa visceral en mujeres es de 110 cm², y para hombres es de 132 cm²; ver, por ejemplo, Wajchenberg, Endocr. Rev. 21 (6): 697-738, 2000.

Métodos de monitorización de terapia

Para evaluar un efecto de la terapia, se puede seguir a un paciente tratado con un polipéptido sFGFR3 utilizando una variedad de biomarcadores de estado de la enfermedad.

- 5 Para un paciente tratado para reducir o prevenir deposición anormal de grasa visceral, las técnicas de monitoreo incluyen, por ejemplo, determinar mejora en el IMC, el diámetro sagital, relación androide:ginoide, circunferencia de cintura, índice de masa de grasa y área de grasa visceral
- 10 en una imagen en sección transversal normalizada del abdomen. El efecto de la terapia también se puede evaluar usando uno o más biomarcadores encontrados en, por ejemplo, una muestra del paciente (por ejemplo, una muestra de sangre, orina o esputo). En el caso de un paciente tratado para prevenir o
- 15 mejorar enfermedades metabólicas, como diabetes o hígado graso, los análisis de sangre para controlar un efecto de la terapia incluyen, por ejemplo, evaluar la muestra de paciente para un cambio en los niveles de glucosa y/o insulina, una mejora en pruebas de tolerancia a la glucosa y una
- 20 disminución en los niveles elevados de alanina transaminasa, aspartato aminotransferasa y/o fosfatasa alcalina.

- Si un paciente recibe terapia con el polipéptido sFGFR3 para tratar o reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, se puede realizar un análisis de sangre
- 25 para mostrar una mejora en el nivel de triglicéridos,

lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad y/o colesterol. Alternativamente, se pueden realizar pruebas de esfuerzo con radioisótopos para mostrar una mejora en tolerancia a ejercicio y/o perfusión cardíaca del

5 paciente.

Para los pacientes tratados para mejorar o reducir el riesgo de demencia, se pueden realizar pruebas de neuropsicología en serie.

En los casos en que se administra el polipéptido

10 sFGFR3 para tratar o reducir el riesgo de infertilidad o irregularidades menstruales, se puede medir el nivel de un biomarcador sanguíneo, tal como hormona folículo estimulante, hormona luteinizante, estradiol y prolactina.

Si un paciente padece o tiene riesgo de apnea del

15 sueño, se puede realizar un estudio que mide, por ejemplo, el oxígeno, la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardíaca, los ronquidos y/o el movimiento corporal del paciente dormido después de la terapia con un polipéptido sFGFR3 para evaluar el efecto de la terapia

En un paciente para quien se administra un

20 polipéptido sFGFR3 para tratar o prevenir enfermedad pulmonar restrictiva o asma, pruebas de función pulmonar que utilizan, por ejemplo, espirometría o pletismografía, pueden usarse para mostrar una mejora en las mediciones pulmonares, tal

25 como volumen de ventilación pulmonar, capacidad vital,

volumen residual y/o capacidad vital forzada.

En un caso en el que las técnicas de monitorización indican que un paciente puede no responder al tratamiento utilizando un polipéptido sFGFR3, o para el que se puede
5 desear un mayor efecto del tratamiento, puede repetirse una o más veces administración de un polipéptido sFGFR3 o se puede aumentar la frecuencia de administración.

Administración de polipéptidos sFGFR3

Se puede administrar un polipéptido sFGFR3 para
10 tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de deposición de grasa visceral anormal. Ejemplos de polipéptidos sFGFR3 incluyen, por ejemplo, polipéptidos sFGFR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 o una variante de la misma que tiene al menos 85% de
15 identidad de secuencia con el mismo (por ejemplo, 86% -100% de identidad de secuencia, tal como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a los mismos). El polipéptido sFGFR3 puede administrarse por cualquier vía conocida en la técnica, tal
20 como por administración parenteral, administración enteral o administración tópica. En particular, el polipéptido sFGFR3 se puede administrar al paciente que tiene una mayor deposición de grasa visceral) por vía subcutánea (por ejemplo, por inyección subcutánea), intravenosa,
25 intramuscular, intraarterial, intratecal o intraperitoneal.

Se puede administrar un polipéptido sFGFR3 a un paciente (por ejemplo, un ser humano) en una dosis predeterminada, como en una cantidad efectiva para tratar la deposición de grasa visceral incrementado sin inducir una toxicidad significativa. Por ejemplo, los polipéptidos sFGFR3 pueden administrarse a un paciente que tiene una mayor deposición de grasa visceral en dosis individuales que varían de aproximadamente 0.002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg (por ejemplo, de 0.002 mg/kg a 20 mg/kg, de 0.01 mg/kg a 2 mg/kg, de 0.2 mg/kg a 20 mg/kg, de 0.01 mg/kg a 10 mg/kg, de 10 mg/kg a 100 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 50 mg/kg, 0.5 mg/kg a 20 mg/kg, 1.0 mg/kg a 10 mg/kg, 1.5 mg/kg a 5 mg/kg, o 0.2 mg/kg a 3 mg/kg). En particular, el polipéptido sFGFR3 se puede administrar en dosis individuales de, por ejemplo, 0.001 mg/kg a 7 mg/kg, tal como 0.3 mg/kg a aproximadamente 2.5 mg/kg.

Dosis de ejemplo de un polipéptido sFGFR3 de la invención) para la administración a un paciente (por ejemplo, un humano) que tiene una deposición de grasa visceral incrementado) incluyen, por ejemplo, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 , 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14 , 15 o 20 mg/kg. Estas dosis se pueden administrar una o más veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más veces) por día, semana, mes o año. Por ejemplo, un

polipéptido sFGFR3 puede administrarse a pacientes en una dosis semanal que varía, por ejemplo, de aproximadamente 0.0014 mg/kg/semana a aproximadamente 140 mg/kg/semana, por ejemplo, aproximadamente 0.14 mg/kg/semana a aproximadamente 105 mg/kg/semana, o, por ejemplo, aproximadamente 1.4 mg/kg/semana a aproximadamente 70 mg/kg/semana (por ejemplo, 5 mg/kg/semana).

Terapia génica

Se puede administrar un polipéptido sFGFR3 a un paciente como una molécula de ácido nucleico. Ejemplos de moléculas de ácido nucleico que se pueden administrar incluyen aquellos que codifican para polipéptidos sFGFR3 que tienen la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 o una variante de la misma que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con los mismos (por ejemplo, 86% - 100 % de identidad de secuencia, como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a eso). Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico pueden tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 10-18 o una variante de la misma con al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86% -100% de identidad de secuencia, como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a los mismos).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para el

polipéptido sFGFR3 pueden administrarse mediante terapia génica, en la que un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 se administra a tejidos de interés y se expresa in vivo. Los métodos de terapia génica se analizan, por ejemplo, en Verme et al. (Nature 389: 239-242, 1997), Yamamoto et al. (Molecular Therapy 17: S67-S68, 2009), y Yamamoto et al., (J. Bone Miner. Res. 26: 135-142, 2011), cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

Un polipéptido sFGFR3 de la invención se puede producido por las células de un paciente (por ejemplo, un humano) que tiene una mayor deposición de grasa visceral mediante la administración de un vector (por ejemplo, un plásmido, un cromosoma artificial (por ejemplo, BAG, PAC y YAC), o un vector viral) que contiene la secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3. Por ejemplo, un vector viral puede ser un vector retroviral, un vector adenoviral o un vector poxviral (por ejemplo, un vector viral vaccinia, tal como Vaccinia Ankara Modificada (MVA)), un vector viral adenoasociado o un vector alfaviral. El vector, una vez dentro de una célula del paciente (por ejemplo, un humano) que tiene un trastorno de retraso de crecimiento esquelético (por ejemplo, acondroplasia), por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio o microinyección directa, promoverá expresión del

polipéptido sFGFR3, que luego se secreta por la célula. La invención incluye además terapias basadas en células, en las que al paciente (por ejemplo, un humano) se le administra una célula que expresa el polipéptido sFGFR3.

5 **Composiciones Farmacéuticas**

Las composiciones farmacéuticas que se pueden administrar para tratar a un sujeto que tiene una deposición anormal de grasa visceral, como se describe aquí, contienen un polipéptido sFGFR3, un polinucleótido que codifica para el

10 polipéptido sFGFR3 o una célula hospedadora que contiene el polinucleótido sFGFR3. El polipéptido sFGFR3 puede tener la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-7 o una variante de la misma que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con el mismo (por ejemplo, 86% -100%

15 de identidad de secuencia, como 86%, 87% , 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a los mismos). Las moléculas de ácido nucleico pueden tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 10-

20 18 o una variante de las mismas con al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 86% -100% de identidad de secuencia, como 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a los mismos). Las composiciones que incluyen un polipéptido sFGFR3, un polinucleótido que codifica para el polipéptido

25 sFGFR3 o una célula hospedadora que contiene el

polinucleótido sFGFR3 se pueden formular en un intervalo de dosis, en una variedad de formulaciones y en combinación con excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

5 Una composición farmacéutica que incluye un polipéptido sFGFR3, un polinucleótido que codifica para el polipéptido sFGFR3 o una célula hospedadora que contiene el polinucleótido sFGFR3 puede formularse a una dosis específica, como una dosis que sea efectiva para tratar a un
10 paciente (por ejemplo, un humano) con aumento de la deposición de grasa visceral sin inducir toxicidad significativa. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para incluir entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 500 mg/ml del polipéptido o polinucleótido
15 sFGFR3 (por ejemplo, entre 10 mg/ml y 300 mg/ml, 20 mg/ml y 120 mg/ml, 40 mg/ml y 200 mg/ml, 30 mg/ml y 150 mg/ml, 40 mg/ml y 100 mg/ml, 50 mg/ml y 80 mg/ml, o 60 mg/ml y 70 mg/mL del polipéptido o polinucleótido sFGFR3).

Las composiciones farmacéuticas que incluyen un
20 polipéptido o polinucleótido sFGFR3 se pueden preparar en una variedad de formas, tal como una solución líquida, dispersión o suspensión, polvo u otra estructura ordenada adecuada para almacenamiento estable. Por ejemplo, las composiciones que incluyen un polipéptido o polinucleótido sFGFR3 propuesto
25 para suministro sistémico o local pueden estar en forma de

soluciones inyectables o infusibles, tal como administración parenteral (por ejemplo, administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal o intraperitoneal). Composiciones de sFGFR3 para inyección (por ejemplo, inyección subcutánea o intravenosa) se pueden formular usando una solución estéril o cualquier líquido farmacéuticamente aceptable como vehículo. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina fisiológica y medios de cultivo celular (por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio de Eagles α -modificado (α -MEM), medio F-12). SE conocen en la técnica métodos de formulación, ver, por ejemplo, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2da ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad

Pueden proporcionarse composiciones que incluyen un polipéptido o polinucleótido sFGFR3 a pacientes (por ejemplo, humanos) que tienen una deposición de grasa visceral incrementada en combinación con excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes, vehículos o diluyentes aceptables pueden incluir solución salina, antioxidantes, conservantes, polímeros, aminoácidos y carbohidratos. Los excipientes, portadores o diluyentes acuosos pueden incluir agua, soluciones de alcohol y agua,

emulsiones o suspensiones que incluyen solución salina, vehículos parenterales médicos amortiguados que incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer
5 que contiene lactosa y aceites fijos. Ejemplos de excipientes, portadores o diluyentes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables.

Sales farmacéuticamente aceptables también se pueden
10 incluir en las composiciones de sFGFR3. Sales farmacéuticamente aceptables de ejemplo pueden incluir sales de ácidos minerales (por ejemplo, clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos) y sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos).
15 Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsionantes y sustancias amortiguadoras de pH. Se encuentra disponible un análisis exhaustivo sobre excipientes, vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables en Remington: The Science and
20 Practice of Pharmacy, 22da Edición, Allen (2012), que se incorpora como referencia en su totalidad.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen un polipéptido o polinucleótido sFGFR3 también se pueden formular con un vehículo que protegerá el polipéptido o
25 polinucleótido sFGFR3 contra liberación rápida, tal como una

formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Por ejemplo, la composición de sFGFR3 puede quedar atrapada en microcápsulas preparadas por técnicas de coacervación o por polimerización

5 interfacial, tal como microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina o poli (metilmetacrilato); sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas); o macroemulsiones. Además, una composición de sFGFR3 se puede

10 formular como una composición de liberación sostenida. Por ejemplo, las composiciones de liberación sostenida pueden incluir matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido o polinucleótido sFGFR3, en el que las matrices están en forma de artículos

15 conformados, tal como películas o microcápsulas.

Ejemplos

Se propone que los siguientes ejemplos ilustren, en lugar de que limiten la descripción.

Ejemplo 1:

20 Diseño de estudio

Para evaluar el potencial de terapia con sFGFR3 (por ejemplo, sFGFR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1) para prevenir desarrollo de obesidad abdominal en acondroplasia, primero se ha caracterizado el desarrollo de obesidad en

25 niños mediante una revisión retrospectiva de gráfica y luego

se ha realizado un estudio en ratones *Fgfr3^{ach/+}*, un modelo de ratón que recapitula la mayoría de los síntomas humanos. Para la revisión de la gráfica, se siguieron once sujetos (5 niñas y 6 niños) con acondroplasia desde el nacimiento hasta los 18 años en el Departamento de endocrinología, enfermedades óseas, ginecología genética y médica del Hospital Infantil de Purpan en Toulouse, Francia. Este estudio de revisión retrospectiva de tabla se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y las regulaciones francesas sobre investigación biomédica, sin requerir aprobación del comité de ética para un estudio no intervencionista. Todos los pacientes albergaban la mutación G380R *FGFR3* (G380R se refiere a la numeración en el *FGFR3* de longitud completa, que incluye el péptido señal; la numeración de residuos sin el péptido señal es G358R (ver la SEQ ID NO: 9), confirmado por pruebas moleculares. Se excluyeron pacientes que reciben cualquier tratamiento de crecimiento. Se siguieron niños en el centro especializado cada 4 meses en promedio. Durante cada visita, los datos incluyeron la altura, peso e índice de masa corporal posterior (IMC = kg/m²). Los análisis de sangre se realizaron solo una vez al año y se realizó una vez absorciometría con rayos X de doble energía (DXA). El estudio con ratones se realizó en ratones transgénicos *Fgfr3^{ach/+}* o sus compañeros de camada de tipo salvaje (WT). Para esto, las camadas se

trataron de forma ciega dos veces por semana mediante inyecciones subcutáneas de 2.5 µg/kg de sFGFR3 o vehículo a partir del día 3 hasta el día 21. Se destetaron los ratones a las 3 semanas de edad. Después de una semana de aclimatación, se estimularon a los ratones con una dieta normal (ND) o alta en grasas (HFD) durante 10 semanas. Se evaluó el desarrollo de obesidad a través de mediciones de composición corporal, calorimetría indirecta y evaluación clásica de perfiles de glucosa y lípidos, así como evaluaciones de función hepática y pancreática. El n por grupo se presenta en la figura 10
leyendas.

Análisis clínico

Cálculos antropométricos, que incluyen puntuación z de altura a edad y el puntuación z de IMC a edad, se realizaron utilizando el software WHO AnthroPlus (WHO AnthroPlus para computadoras personales Manual: Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Ginebra: OMS, 2009 (www.who.int/growthref/tools/en/); los puntajes z se basan en las normas de la OMS (desde el nacimiento hasta los 60 meses) y la referencia de la OMS 2007 (61 meses a 19 años). La composición corporal se evaluó por DXA utilizando Dispositivo Lunar Prodigy (GE Healthcare). Las regiones de interés (ROI) para composición corporal regional se definieron utilizando las instrucciones del fabricante (figura 1B). Brevemente, se

midió la ROI del tronco desde el corte pélvico (límite inferior) hasta el corte del cuello (límite superior); se midió la ROI androide desde el corte pélvico (límite inferior) hasta el corte pélvico en un 20% de la distancia entre los cortes del cuello y pélvico (límite superior); la ROI del ombligo se definió del límite inferior androide en un 150% de la distancia androide, y la ROI ginoide fue desde el límite inferior de la ROI del ombligo hasta una línea igual al doble de la altura de la ROI androide (límite inferior).

Se extrajeron muestras de sangre después de un período de ayuno de al menos 12 horas y se analizaron en el Instituto Federativo de Biología (IFB) del hospital de Purpan. Se midieron las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas, colesterol total, HDL y LDL, triglicéridos, TGO, TGP, gGT, así como plasma total de calcio, sodio, potasio, bicarbonato, fosfato, cloruro y fosfatasa alcalina utilizando métodos enzimáticos colorimétricos o colorimétricos estándar en el analizador modular serie Cobas 8000, utilizando el módulo C701, de Roche Diagnostics. La concentración sérica de vitamina D 25OH total se midió mediante el método de inmunoensayo quimioluminiscente en la serie de analizadores modulares Cobas 8000, utilizando el módulo E602, de Roche Diagnostics. Todos los valores se compararon con los valores de referencia establecidos para cada grupo de edad dentro del Hospital infantil y utilizando referencias publicadas

(Mellerio et al., Pediatrics 129: e1020-1029 (2012); Fischer et al., Ann. Clin. Biochem. 49: 546 -553, 2012; y Haine et al., J. Bone Miner. Res. 30: 1369-1376, 2015). Después de 12 horas de ayuno nocturno, se realizó OGTT en pacientes según

5 las recomendaciones establecidas (Alberti et al., Diabet. Med. 15: 539-553, 1998). Después de la administración oral de 1.75 g/kg de glucosa, se extrajeron muestras de sangre al inicio del estudio y después de 30 y 120 minutos para medir la concentración de glucosa utilizando el método de

10 hexoquinasa. La regulación de glucosa se evaluó de acuerdo con las pautas de la Asociación Americana de Diabetes: se definió regulación normal de glucosa como glucosa en ayunas <5.6 mmol/L y glucosa en 120 minutos <7.8 mmol/L y glucosa alterada en ayunas como glucosa en ayunas 5.6 - 6.9 mmol/L,

15 intolerancia a la glucosa como glucosa en 120 min 7.8 - 11.0 mmol/L.

Animales y tratamiento

Se realizaron experimentos en ratones transgénicos Fgfr3ach/+ (Naski et al., Development 125: 4977-4988, 1998).

20 Al destete, se usaron biopsias de oído para verificar el genotipo de los ratones mediante PCR del ADN genómico como se describió anteriormente (Garcia et al., Science Translational Medicine 5: 203ra124, 2013).

Durante el experimento, los ratones se alojaron en

25 condiciones de laboratorio normales y se les permitió acceder

a alimentos y agua a voluntad. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional local para el uso de Animales de Laboratorio (CIEPAL Azur) (aprobaciones #NCE-2012-52 y NCE-2015-225). En el día 3, los ratones recién nacidos fueron

5 tratados con 2.5 mg/kg de sFGFR3 etiquetado con FLAG como se describió anteriormente (Garcia et al., Science Translational Medicine 5: 203ra124, 2013). Las camadas de control recibieron 10 μ l de PBS que contenía 50% de glicerol (vehículo). Desde el día 3 hasta el día 22, los ratones

10 Fgfr3ach/+ recibieron 6 inyecciones subcutáneas de sFGFR3 o vehículo. Una semana después del destete a las 4 semanas de edad, los ratones tratados y no tratados se dividieron en dos grupos y se estimularon durante 10 semanas con una dieta normal (ND, A03, SAFE) o alta en grasas (HFD, 52% de kcal

15 como grasa, hecha a medida, que contiene 54% de lípidos, SAFE), respectivamente. Después de 6 horas de ayuno, se extrajo sangre de la vena de la cola. Se midió glucemia con un glucómetro (Abbot) y se determinó contenido de insulina en suero mediante ELISA (Mercodia). Las pruebas de tolerancia a

20 glucosa (GTT) se realizaron en ratones después de 10 semanas de estímulo ND o HFD. Después de 6 horas, se inyectó a los ratones en ayunas una solución de glucosa intraperitoneal (1 g/kg). Se extrajo sangre de la vena de la cola y se monitorizaron los niveles de glucosa a lo largo del tiempo

25 usando un glucómetro o usando el kit de análisis de glucosa

EnzyChrom (BioAssay Systems). Los niveles de glucosa se normalizaron al valor de tiempo -15 min de cada ratón.

Se estudió calorimetría indirecta en ratones estimulados durante 10 semanas con una dieta normal (ND) o alta en grasas (HFD). Como se indicó anteriormente, los ratones se trataron durante el período de crecimiento con 2.5 mg/kg de sFGFR3 o vehículo, se sometieron al estímulo de dieta durante 2 semanas y luego se sometieron a las cámaras metabólicas. Después de 24 h de aclimatación en jaulas metabólicas individuales, se midió consumo de O₂ (VO₂) y producción de CO₂ (VCO₂) (Oxylet; Panlab-Bioseb) en ratones individuales a intervalos de 32 min durante un período de 24 h con acceso ilimitado a los alimentos seguido de una noche en ayunas. El cociente respiratorio se calculó y analizó de la siguiente manera: $RQ = VCO_2/VO_2$, $RQ = 1$ corresponden a oxidación de carbohidratos y $RQ \sim 0.7$ corresponden a oxidación de grasas. Se calculó gasto energético ($kcal/día/peso^{0.75} = 1.44 \times VO_2 \times [3.815 + 1.232 \times RQ]$), oxidaciones de carbohidratos ($g/min/kg^{0.75} = [4.55 \times VCO_2] - [3.21 \times VO_2]$) y lípidos ($g/min/kg^{0.75} = [1.67 \times VO_2] - [1.67 \times VCO_2]$). Se monitorizaron las actividades ambulatorias y crianza de los ratones mediante una tecnología de transductor de peso o un método de interrupción de haz de fotoceldas infrarrojas (Oxylet; Panlab-Bioseb).

La composición corporal se determinó usando un

sistema de micro-CT de rayos X SkyScan 1178. Ratones de cuatro y 10 semanas de edad se anestesiaron y escanearon utilizando los mismos parámetros: 104 μm de tamaño de píxel, 49 kV, filtro de aluminio de 0.5 mm de espesor, 0.9 ° de paso de rotación. El volumen total de tejido adiposo se determinó entre la punta del hocico y la parte superior de la cola y el volumen de tejido adiposo abdominal se determinó entre el L1 lumbar y el S1 sacro. Luego, se realizó con mayor precisión cuantificación del tejido adiposo. El análisis de la composición corporal se basa en la delimitación de la región de interés después de la reconstrucción 3D de imágenes escaneadas. Se realizaron análisis de reconstrucción 3D usando el software NRecon y CTAn (Skyscan).

En el sacrificio, se pesaron los animales y se recogieron varios tejidos y órganos (tejido adiposo epididimario subcutáneo, hígado, páncreas) para su posterior análisis por histoquímica o qPCR. En algunos grupos, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea se recolectaron enjuagando los fémures (Zhu et al., Nat Protoc 5: 550-560, 2010).

El perfil lipídico se evaluó tomando sangre intracardiaca. Se midió colesterol total, triglicéridos (TG), lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) en suero usando un analizador Beckman AU 2700. Los sueros se analizaron para determinar los niveles de

proteína de adipocinas seleccionadas relacionadas con inflamación, obesidad, vía de insulina o FGF utilizando la matriz de adipocinas de ratón (# ARY013, R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante sobre membranas de nitrocelulosa. Después de la detección quimioluminiscente y estreptavidina-HRP, las proteínas unidas a cada anticuerpo capturado se cuantificaron usando densitometría y se compararon niveles con el cambio porcentual de los ratones WT.

10 **Estudios de células madre mesenquimales**

Se aislaron células madre mesenquimales de la médula ósea femoral que se proporciona de ratones tratados con sFGFR3 o sin tratar de 6 a 8 semanas de edad al enjuagar los fémures (Zhu et al., Nat. Protoc. 5: 550-560, 2010) y cultivados hasta 80% de confluencia en medio suplementado con 10% de suero. Luego, el medio se reemplazó con medio adipogénico (DMEM F12 suplementado con suero al 2%, antibióticos al 1%, insulina 66 mM, triyodotironina 1 nM, cortisol 100 mM, transferrina 10 µg/ml y rosiglitazona 3 µM en DMEM-F12). Los ARN totales se extrajeron usando reactivo Trizol (Life Technologies) y cloroformo (Sigma). Un microgramo de ARN total se transcribió inversamente en ADNc utilizando hexámeros aleatorios y el kit de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Se realizó qPCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus

(Applied Biosystems) con Fast SYBR Green Master Mix (Sigma) utilizando una matriz de PCR RT2 Profiler personalizada (CAPM13080). Los genes estudiados se enumeran en la Tabla 1. La expresión génica se normalizó a genes consecutivo HPRT, RPL13a y RPL6. La expresión de FGFR se realizó usando los siguientes cebadores: FGFR1, For-5' CAGATGCACTCCCATCCTCG 3' Rev-5' TCT GGGGATGTCCAGTAGGG 3'; FGFR2 For-5' TGGCAGTGAAGATGTTGAAAG 3' Rev-5' ATCATCTTCATCATCTCCATCTCTTG 3'; FGFR3 For-5' TTATCCTTGGCTCCTGGGTG 3' Rev-5' CTGGAAGGTAGCAGTGGGAA 3'; FGFR4 For-5' GCTCGGAGGTAGAGGTCTTGT 3' Rev-5' CCACGCTGACTGGTAGGAA 3'; HSP90 For-5' TTTGGTGGACACAGGCATTG 3' Rev-5' CAAACTGCCCGATCATGGAG 3'.

Tabla 1. Lista de genes estudiados utilizando matriz de PCR de perfilador RT2 personalizada en células madre mesenquimales

Símbolo de gen	Nombre Completo Oficial	Refseq #
Adipoq	Adiponectina, que contiene dominio A1Q y colágeno	NM_0096Q5
Cebpa	CCAAT/proteína potenciadora de unión (C/EBP), alfa	NM_007678
Cebpb	CCAAT/proteína potenciadora de unión (C/EBP), beta	NM_009883
Cebpd	CCAAT/proteína potenciadora de unión (C/EBP), delta	NM_007679
Dlk1	Homólogo tipo delta 1 (Drosophila)	NM_010052
Fabp4	Proteína de unión a ácido graso 4, adipocito	NM_024406
Fasn	Ácido graso sintasa	NM_007988
Gata3	Proteína de unión a GATA 3	NM_008091

5	Hprt	Hipoxantina guanina fosforibosil transferasa	NM_013556
	Lep	Liptina	NM_008492
	Lipe	Lipasa, sensible a hormona	NM_010719
	Lpl	Lipoproteína lipasa	NM_008509
	Pparg	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas	NM_011146
10	Ppargc1a	Coactivador 1 alfa de receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas	NM_008904
	Rpl13a	Proteína ribosómica L13a	NM_009438
	Rpl6	Proteína ribosómica L6	NM_011290
	Scd1	Estearoil-coenzima A desaturasa 1	NM_009127
	Slc2a4	Familia de transportadores de solutos (transportador de glucosa facilitado), miembro 4	NM_009204
10	Srebf1	Factor de transcripción 1 de unión a elemento regulador de esterol	NM_011480
	Ucp1	Proteína desacoplante 1 (transportador de protones, mitocondrial)	NM_009463
	Wnt1	Sitio de integración MMTV 1 relacionado con sin alas	NM_021279

15 Para experimentos de señalización de insulina, 24 h después del aislamiento, las células se agotaron durante 6 h y luego se estimularon con insulina 50 nM durante 0, 5, 15, 30 min, o con 0, 1, 10, 50, 100 nM durante 5 min. Los extractos celulares se procesaron para análisis de Western

20 Blot. Para esto, las células se lisaron en solución amortiguadora de lisis RIPA (Millipore) y se homogeneizaron durante 30 minutos usando un vórtice. Las proteínas se sedimentaron por centrifugación a 1400 g de 15 minutos y el contenido total de proteínas se evaluó utilizando el kit de

25 ensayo de proteínas BCA (ThermoScientific). Las muestras se

diluyeron en solución amortiguadora, reductora de muestras (tecnología de vida), se hirvieron y se procesaron para inmunotransferencia usando un procedimiento estándar. Los anticuerpos monoclonales se usaron de la siguiente manera:

5 anti p44/42 MAPK (Erk1/2) (4695S, señalización celular), anti-fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (4370S, señalización celular). Los resultados se normalizaron a la expresión de HSP90 (4877S, Cell Signaling).

Histología e inmunohistoquímica

10 Se realizaron análisis histológicos en tejido adiposo, hígado y páncreas de ratones de 12 semanas de edad. Los órganos se fijaron en formalina al 4% durante 24 h, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina. Los diámetros de los adipocitos se

15 midieron en una o dos secciones diferentes en cada muestra (se contaron de 100 a 300 adipocitos en cada sección).

Los números y el área de los islotes pancreáticos se midieron en una sección utilizando el sistema Fiji Image J (el área de los islotes se normalizó al área total del

20 páncreas). El contenido de glucógeno hepático se evaluó mediante tinción periódica con ácido Shiff (PAS). Se realizó inmunohistoquímica en secciones de 5 µm de páncreas. Las secciones se bloquearon 45 minutos con BSA al 1% en PBS, se incubaron durante la noche con anticuerpo primario monoclonal

25 antiinsulina (4 µg/ml) (Santa Cruz, sc-9168), anticuerpo

policlonal anti-glucagón (4 µg/ml) (Santa Cruz, sc -7779) y 1 h con anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (2 µg/ml) (Life Technologies, A-21442) y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (4 µg/ml) (Life Technologies, A-21467) en cámara húmeda.

5 Las secciones se contratiñeron con solución DAPI (Santa Cruz), se trataron con reactivo eliminador de autofluorescencia y se visualizaron bajo microscopía de fluorescencia. La tinción sin anticuerpo secundario se uso como control negativo.

10 **Análisis estadístico**

Se realizaron análisis estadísticos con el software GraphPad Prism 6.0. Se expresaron datos como media $\pm$ DE. Para verificar normalidad y varianza igual, se realizó una prueba de normalidad general de Agostino y Pearson ($\alpha = 0.05$), una
 15 prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$) y una prueba de normalidad KS ($\alpha = 0.05$). Se determinó la significacion mediante el uso de la prueba t de Student de dos colas no emparejada o la prueba de comparación múltiple de Tukey. En los pacientes, los resultados brutos de estatura e IMC se
 20 transformaron en una puntuación z específica por edad a partir del promedio en la población de referencia utilizando datos de referencia. El resultado medio esperado de estos valores en una población sana es 0. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ***
 25 $P < 0.001$).

Ejemplo 2

Pacientes con acondroplasia desarrollan un exceso de tejido adiposo abdominal sin complicaciones clásicas

Los sujetos fueron niños y adolescentes con
5 acondroplasia. Se incluyeron en un estudio longitudinal retrospectivo realizado por el mismo observador para un promedio de 8.6 ± 5.6 años. Las medidas antropométricas y la composición corporal se registraron desde el nacimiento durante las visitas de seguimiento y se compararon entre tres
10 grupos de edad que van desde [0-3], [4-8] y [9-18] años. Se midieron y compararon varios parámetros metabólicos de la sangre en los diferentes grupos de edad. Los valores sanguíneos para visitas por debajo de edad de 3 años no se consideraron debido a la dificultad de restringir la ingesta
15 de alimentos en los bebés y, por lo tanto, controlar los parámetros metabólicos a esta temprana edad.

Se sabe que los pacientes con acondroplasia no solo muestran problemas de crecimiento, sino que también tienen una tendencia a aumentar de peso excesivamente, lo que
20 conduce al sobrepeso o incluso a la obesidad (Hoover-Fong et al., Am. J. Med. Genet. A. 143A: 2227- 2235, 2007). Como se ve en la figura 1A, el IMC de los pacientes con acondroplasia aumentó significativamente durante la infancia, hasta alcanzar un valor de aproximadamente 30 kg/m² en el grupo de
25 [9-18] años ($P = 0.2407$ entre grupos[0-3] y [4-8], $P < 0.0001$

comparando el grupo [9-18] con los otros dos grupos, Prueba de comparaciones múltiples de Tukey). Se observó una correlación negativa entre el IMC y la altura (coeficiente de Pearson $r = -0.5660$, $P = 0.0021$), con una tendencia para que los niños más pequeños tengan el IMC más alto. Para estudiar su estado metabólico y su evolución, primero se realizaron análisis de densitometría para determinar la distribución de grasa corporal y masa magra en los diferentes grupos de edad (figura 1B). Observamos que hasta los 8 años de edad, la proporción de grasa total: magra era relativamente constante y que aumentó significativamente durante la adolescencia, de 0.21 ± 0.02 y 0.20 ± 0.05 en los grupos de edad [0-3] y [4-8] a 0.84 ± 0.29 en el grupo de edad [9-18], respectivamente ($P = 0.9954$ entre los grupos [0-3] y [4-8], $P = 0.0053$ y $P < 0.0001$ comparando grupos de edad [9-18] con [0-3] y [4-8], respectivamente, prueba de comparaciones múltiples de Tukey) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de densitometría de pacientes con acondroplasia en los tres grupos de edad. Los valores son media $\pm$ SD (rango). Los valores p representan la significación de la diferencia entre los tres grupos (prueba ANOVA unidireccional seguida de las pruebas de comparación múltiple de Tukey, ns = no significativo). Resultados de análisis post hoc: un grupo significativamente diferente entre [0-3] y [4-8]; b significativamente diferente entre

grupos [0-3] y [9-18]; c significativamente diferente entre grupos [4-8] y [9-18].

Edad (años)	[0-3]		[4-8]		[9-18]		
Variables	Media $\pm$ SD	Intervalo (mín-máx)	Media $\pm$ SD	Intervalo (mín-máx)	Media $\pm$ SD	Intervalo (mín-máx)	
5							
Repartición de masa grasa y magra (kg)							<i>P</i>
Masa grasa corporal total	1.52 $\pm$ 0.32	(1.29-1.76)	2.64 $\pm$ 0.73	(1.98-4.06)	19.78 $\pm$ 7.98	(8.56-30.15)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra corporal total	0.88 $\pm$ 0.04	(0.86-0.91)	0.84 $\pm$ 0.09	(0.75-0.90)	0.46 $\pm$ 0.01	(0.46-0.68)	0.001 ^{b, c}
Masa de tronco	3.67 $\pm$ 0.45	(3.38-4.02)	6.93 $\pm$ 1.46	(4.83-8.68)	21.19 $\pm$ 5.53	(14.08-28.72)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa grasa de tronco	0.41 $\pm$ 0.12	(0.32-0.49)	0.83 $\pm$ 0.44	(0.23-1.64)	9.74 $\pm$ 4.42	(3.97-15.65)	0.001 ^{b, c}
Masa magra de tronco	3.29 $\pm$ 0.33	(3.06-3.53)	6.11 $\pm$ 1.15	(4.35-7.08)	11.4 $\pm$ 1.50	(9.67-13.42)	< 0.0001 ^{a, b, c}
Masa de piernas	1.77 $\pm$ 0.28	(1.57-1.97)	4.61 $\pm$ 1.29	(3.12-7.21)	13.89 $\pm$ 3.36	(8.86-18.24)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa grasa de piernas	0.65 $\pm$ 0.12	(0.57-0.73)	1.22 $\pm$ 0.31	(0.86-1.69)	7.46 $\pm$ 2.61	(3.39-10.72)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra de piernas	1.11 $\pm$ 0.16	(0.99-1.23)	3.39 $\pm$ 1.04	(2.26-5.52)	6.31 $\pm$ 0.98	(4.81-7.51)	< 0.0001 ^{a, b, c}
Masa de brazos	0.65 $\pm$ 0.04	(0.62-0.68)	1.21 $\pm$ 0.23	(0.99-1.53)	3.74 $\pm$ 1.03	(2.38-5.12)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa grasa de brazos	0.09 $\pm$ 0.06	(0.08-0.10)	0.21 $\pm$ 0.09	(0.12-0.35)	1.57 $\pm$ 0.76	(0.56-2.54)	0.004 ^{b, c}
Masa magra de brazos	0.56 $\pm$ 0.04	(0.53-0.58)	0.99 $\pm$ 0.18	(0.66-1.18)	2.16 $\pm$ 0.34	(1.62-2.65)	0.001 ^{b, c}
10							
Repartición de masa magra y grasa (% peso corporal total)							
Masa grasa corporal total	19.04 $\pm$ 0.74	(18.51-19.57)	16.08 $\pm$ 3.10	(11.86-21.40)	42.93 $\pm$ 9.11	(28.36-52.89)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra corporal total	88.29 $\pm$ 3.51	(85.81-90.77)	83.89 $\pm$ 9.25	(74.75-90.43)	46.19 $\pm$ 0.79	(45.63-68.49)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa de tronco	46.47 $\pm$ 2.57	(44.64-48.29)	47.26 $\pm$ 4.08	(28.42-50.15)	50.35 $\pm$ 0.06	(45.00-50.40)	ns
Masa grasa de tronco	5.01 $\pm$ 0.64	(4.56-5.46)	5.60 $\pm$ 1.74	(1.37-8.65)	27.11 $\pm$ 0.50	(13.16-27.46)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra de tronco	41.47 $\pm$ 3.22	(39.19-43.74)	41.66 $\pm$ 5.82	(27.05-45.78)	23.24 $\pm$ 0.44	(22.71-33.47)	0.004 ^{b, c}
Masa de piernas	22.14 $\pm$ 0.37	(21.88-22.40)	25.22 $\pm$ 0.28	(25.03-42.45)	31.13 $\pm$ 1.24	(29.68-32.32)	0.0285 ^c
Masa grasa de piernas	8.17 $\pm$ 0.02	(8.16-8.19)	6.94 $\pm$ 0.87	(5.95-9.95)	18.05 $\pm$ 1.08	(11.23-19.32)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra de piernas	13.97 $\pm$ 0.40	(13.69-14.26)	18.28 $\pm$ 0.60	(17.64-32.50)	13.07 $\pm$ 0.16	(12.96-18.44)	0.0122 ^c
Masa de brazos	8.21 $\pm$ 0.88	(7.59-8.83)	7.33 $\pm$ 0.21	(6.66-8.07)	8.89 $\pm$ 0.14	(7.60-8.99)	0.0032 ^c
Masa grasa de brazos	<0.001	(10 ⁻⁶ -10 ⁻⁵)	1.08 $\pm$ 0.42	(0.78-1.88)	4.40 $\pm$ 0.09	(1.86-4.46)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra de brazos	7.05 $\pm$ 0.76	(6.51-7.59)	6.25 $\pm$ 0.21	(5.44 $\pm$ 6.60)	4.49 $\pm$ 0.23	(4.25-6.04)	0.0005 ^{b, c}
15							
Composición corporal ginoide y androide (% de tejido total)							
Grasa corporal ginoide	43.75 $\pm$ 0.07	(43.70-43.80)	33.97 $\pm$ 3.00	(29.30-38.40)	52.91 $\pm$ 6.37	(40.60-58.80)	0.0007 ^c
Grasa corporal androide	13.45 $\pm$ 3.47	(11.00-15.90)	14.73 $\pm$ 4.02	(8.90-19.50)	44.79 $\pm$ 11.39	(29.90-55.90)	< 0.0001 ^{b, c}
Masa magra corporal ginoide	56.25 $\pm$ 0.07	(56.20-56.30)	67.52 $\pm$ 4.70	(60.90-74.91)	47.10 $\pm$ 6.38	(40.50-58.70)	ns
Masa magra corporal androide	86.6 $\pm$ 3.40	(84.20-89.00)	85.27 $\pm$ 3.97	(80.52-91.07)	55.21 $\pm$ 11.39	(44.10-69.20)	ns

De manera interesante, como se ve en la figura 1C, el aumento en la masa de grasa no fue homogéneo y los pacientes desarrollaron preferentemente masa de grasa abdominal (androide) (+ 204%) sobre masa grasa de cadera (ginoide) (+ 55%) (P = 0.0974 entre grupos [0-3] y [4-8], P = 0.0002 y P = 0.001 comparando grupos de edad [9-18] con [0-3] y [4-8], respectivamente, prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

Al mismo tiempo, las masas magras androide y ginoide no variaron durante este período (Tabla 1). En consecuencia, la proporción de grasa:magra aumentó significativamente en el área abdominal durante la infancia ($P = 0.3187$ entre los grupos [0-3] y [4-8], $P = 0.0924$ y $P < 0.0001$ comparando grupos de edad [9-18] con [0- 3] y [4-8], respectivamente, prueba de comparaciones múltiples de Tukey). El tronco, las piernas y los brazos siguieron una tendencia muy similar con un aumento del porcentaje de masa grasa y una disminución del porcentaje de masa magra desde la infancia hasta la edad adulta (Tabla 1). Se determinó densidad mineral ósea espinal (BMD) entre L1 y L4 después de los 3 años. En ambos grupos de edad, se encontró que la BMD estaba por debajo del valor de intervalo normal apropiado para la edad (van der Sluis et al., Arch. Dis. Child. 87):341-347, 2002) (0.511 ± 0.065 g/cm² y 0.898 ± 0.223 g/cm² en los grupos de edad [4-8] y [9-18], respectivamente, en comparación con 0.645 ± 0.071 g/cm² y 0.913 ± 0.199 g/cm² en los mismos grupos de edad de referencia).

Se compararon diferentes parámetros sanguíneos entre los grupos de edad [4-8] y [9-18]. Inesperadamente, en ambos grupos de edad e independientemente de su IMC, los niños con acondroplasia mostraron una tendencia al colesterol total plasmático bajo (3.38 ± 0.36 mmol/L y 3.73 ± 0.44 mmol/L en los grupos de edad [4-8] y [9-18], respectivamente, con

valores normales comprendidos entre 3.90 y 5.70 mmol/L en niños), y triglicéridos bajos (0.56 ± 0.14 mmol/L y 0.63 ± 0.13 mmol/L en grupos de edad [4-8] y [9-18], respectivamente, con valores normales comprendidos entre 0.60 y 1.70 mmol/L en niños). Del mismo modo, la glucosa en sangre en ayunas (figura 1D) y los niveles de insulina no aumentaron con la edad y se mantuvieron dentro del intervalo normal (7.3 ± 5.4 mUI/L y 13.4 ± 3.4 mUI/L en grupos de edad [4-8] y [9-18], respectivamente, con valores normales comprendidos entre 2.6 y 16 mUI/L en niños). Estos resultados fueron confirmados por los niveles de glucosa obtenidos durante prueba oral de tolerancia a glucosa (OGTT), que mostró niveles normales de glucosa a los 0, 30 y 120 minutos después de la administración oral (4.53 ± 0.22 mmol/l a los 0 min, 7.97 ± 1.72 mmol/l a 30 min y 5.17 mmol/l a 120 min). No se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos de edad. Debido a los altos niveles de hemólisis durante la OGTT, desafortunadamente no hubo datos disponibles sobre los niveles de insulina.

Todos los demás parámetros sanguíneos estuvieron dentro del intervalo normal (datos no mostrados).

*Se observan alteraciones metabólicas en ratones *Fgfr3ach/+* delgados y obesos y se corrigen por tratamiento de *sFGFR3*.*

Para determinar el papel de FGFR3ach en este

desarrollo preferencial de la obesidad visceral en la acondroplasia, se trataron ratones transgénicos *Fgfr3ach/+* portadores de mutación G380R o sus compañeros de camada de tipo salvaje (WT) con sFGFR3 o vehículo durante 3 semanas a partir del día 3. Los ratones entonces se estimularon con una dieta normal (ND) o alta en grasas (HFD) a partir de las 4 semanas de edad durante un período de 10 semanas para evaluar el desarrollo de obesidad.

Después del destete, a las 4 semanas de edad, como se esperaba, los ratones *Fgfr3ach/+* no tratados tuvieron una disminución de 20.4% en peso corporal en comparación con sus compañeros de camada WT. Esto se asoció con una reducción de tejidos magros y grasos (50% y 33.9% respectivamente). Los animales tratados mostraron una disminución de 14.1% en peso corporal en comparación con los ratones WT ($P < 0.0001$).

Después de 10 semanas de estímulo de dieta, todos los grupos HFD mostraron un aumento significativo en peso corporal en comparación con ND (figura 2A). Curiosamente, sin embargo, la composición corporal fue diferente en ambos genotipos. Los ratones *Fgfr3ach/+* no tratados tuvieron una mayor proporción de grasa magra abdominal: medida entre L1 y S1, en comparación con los ratones WT, independientemente de la dieta (figura 2B). Cuando se alimentaron con ND, los ratones *Fgfr3ach/+* no tratados tenían menos tejido adiposo epididimario (visceral) y subcutáneo que los animales WT

(Figuras 2C y 2D). Sin embargo, después de 10 semanas de estímulo HFD, los ratones *Fgfr3ach/+* no tratados desarrollaron más tejido adiposo epididimal en comparación con los animales WT que desarrollaron preferentemente una deposición de grasa subcutánea (figura 2C y 2D). Estos datos mostraron que, al igual que los pacientes con acondroplasia, los ratones *Fgfr3ach/+* eran propensos a desarrollar tejido adiposo visceral.

El tratamiento de sFGFR3 no tiene efecto sobre el aumento de peso corporal (figura 2A). Sin embargo, la composición corporal se vio significativamente afectada por el tratamiento de sFGFR3 con una disminución significativa en la proporción de grasa magra abdominal en ratones alimentados con ND (figura 2B), causada por una disminución en las masas magras y un aumento en las masas grasas, respectivamente. De manera muy interesante, los ratones *Fgfr3ach/+* tratados con sFGFR3 mostraron distribuciones de deposición de grasa que eran similares a las de los animales WT, ya sea que se alimentaran con ND o HFD (figuras 2C y 2D).

Después del estímulo HFD, los análisis histológicos mostraron adipocitos más pequeños en el área subcutánea y una mayor proporción de estos pequeños adipocitos en ratones *Fgfr3ach/+* no tratados en comparación con WT (figuras 2E y 2G). No se observó diferencia en el tamaño o la dispersión en los adipocitos epididimarios entre ambos genotipos (figuras

2F y 2H). El tratamiento de sFGFR3 restableció el tamaño y la dispersión de los adipocitos subcutáneos e indujo un ligero aumento en el tamaño de los adipocitos epididimarios (figuras 2E-2H). Debido a que una mayor proporción de células adiposas pequeñas se ha asociado con inflamación (Kursawe et al., Diabetes 59: 2288-2296, 2010; y Lafontan, Diabetes Metab. 40: 16-28, 2014), se midieron varias adipocinas circulantes para evaluar la grado de inflamación sistémica en estos animales (figuras 6A y 6B). Las adipocinas se clasificaron en cuatro categorías: proinflamatorias, relacionadas con obesidad, vía de insulina y FGF, todas las cuales aumentaron en ratones transgénicos en comparación con los compañeros de camada WT (Tabla 3). Los ratones Fgfr3ach/+ no tratados mostraron una línea de base inflamatoria de bajo grado en comparación con los animales WT, que se exacerbó bajo el estímulo HFD (Tabla 3). Los animales tratados con Fgfr3ach/+ bajo ND o HFD tienen un perfil sistémico que se parecía al de sus compañeros de camada WT. In vitro, las células madre mesenquimales (MSC) aisladas de ratones Fgfr3ach/+ mostraron que los genes tempranos e intermedios del proceso de diferenciación como Srebf-1, CEBP/d, CEPB/a y PPARg ya estaban expresados (figura 3A). Muy interesante, las MSC aisladas de ratones Fgfr3ach/+ tratados con sFGFR3 mostraron un aumento significativo en los marcadores antiapiógenos y marcadores de activación del tejido de ceja, así como una disminución de la expresión de

genes implicados en las funciones de los adipocitos maduros (figura 3A). Junto con los datos in vivo, esto sugiere una predisposición a adipogénesis en ratones *Fgfr3^{ach/+}* que puede prevenirse mediante tratamiento de sFGFR3.

5 **Tabla 3. Ratones *Fgfr3^{ach/+}* sin tratar mostraron una referencia inflamatoria elevada impedida por tratamiento de sFGFR3. Expresión de adipocinas circulantes pro-inflamatorias, obesidad, vía de insulina y FGF llevada a cabo ratones en WT y *Fgfr3^{ach/+}* tratados con vehículo y *Fgfr3^{ach/+}* tratados con**
 10 **sFGFR3 después de 10 semanas de estímulo ND o HFD. = "-" <2 unidades arbitrarias (A.U.), '+' = 10-30 A.U., '++' = 30-100 A.U., '+++' >100 A.U.**

	ND			HFD		
	WT	<i>Fgfr3^{ach/+}</i>		WT	<i>Fgfr3^{ach/+}</i>	
marcadores (n)	vehículo	Vehículo	2.5 mg/kg De sFGFR3	Vehículo	vehículo	2.5 mg/kg de sFGFR3
Pro-inflamatoria (14)	+	++	+	+	++	+
Obesidad (15)	++	+++	+	++	+++	++
Vía de Insulina (7)	++	++	++	++	+++	++
FGF [2]	+	+	-	-	++	-

20

En comparación con sus compañeros de camada WT, los ratones que portaban mutación FGFR3 tenían una glucemia en ayunas baja y niveles basales de insulina muy bajos (figura 4A). Cuando se estimularon con una dieta HFD (figura 4B), los
 25 niveles glucémicos aumentaron pero permanecieron por debajo

de los de los animales WT. Los niveles de insulina permanecieron extremadamente bajos. En los animales Fgfr3ach/+ tratados con sFGFR3, se restableció la glucemia y los niveles de insulina aumentaron significativamente en
5 comparación con los ratones Fgfr3ach/+ no tratados (figuras 4A y 4B).

Para evaluar el desarrollo de intolerancia a glucosa, se realizaron pruebas de tolerancia a glucosa (GTT) después de 10 semanas de estímulo de dieta. Los ratones Fgfr3ach/+ no
10 tratados mostraron niveles de glucosa y AUC más altos en comparación con sus compañeros de camada WT (C_{max} 320.9 ± 32.0 mg/dL y 273.3 ± 23.9 mg/dL, AUC $1.2 \times 10^4 \pm 0.7 \times 10^4$ y $1.7 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^4$, respectivamente), mostrando algunos intolerancia basal a glucosa incluso bajo ND. Esto se
15 exacerbó aún más bajo HFD (figura 4C). Cuando los ratones Fgfr3ach/+ se trataron con 2.5 mg/kg de sFGFR3, se restablecieron las respuestas normales de GTT (figura 4C). Se intentó realizar una prueba de tolerancia a la insulina en ratones transgénicos bajo ND o HFD pero, debido a sus niveles
20 glucémicos basales más bajos, los ratones Fgfr3ach/+ no admitían la inyección de insulina y murieron rápidamente. El análisis de sensibilidad a insulina de las células madre mesenquimales aisladas de ratones Fgfr3ach/+ o WT no mostró diferencias en niveles de fosforilación Erk1/2 que sugieren
25 una respuesta similar a la estimulación con insulina en ambos

tipos de ratones (figura 3B). Estos resultados sugieren que los ratones *Fgfr3ach/+* no parecen ser más sensibles a la regulación de insulina, sino que la inyección de insulina durante la ITT probablemente indujo hipoglucemia letal debido a su baja glucemia basal. Los análisis de páncreas mostraron más islotes de Langerhans más pequeños y con menores contenidos de insulina y glucagón en ratones *Fgfr3ach/+* no tratados (figura 4D), lo que sugiere una alteración en producción y/o almacenamiento de insulina. Esto fue parcialmente restaurado en animales tratados (figuras 3B y 4A-4C). El almacenamiento de glucosa también pareció deteriorado en el hígado de los animales *Fgfr3ach/+* no tratados como se ve por la disminución del glucógeno en las secciones de hígado (figura 4E). Como se esperaba, después de 10 semanas de estímulo HFD, los ratones WT desarrollaron esteatosis macrovesicular de grado III con más de 75% de los hepatocitos mostraron vacuolas lipídicas que fueron más grandes que el núcleo (figura 4E). En contraste, después de 10 semanas de HFD, los ratones *Fgfr3ach/+* no tratados desarrollaron nódulos hepáticos benignos reversibles (figura 4F) y una esteatosis microvesicular de grado II: menos del 50% de los hepatocitos mostraron pequeñas vacuolas (figura 4E). Curiosamente, el tratamiento de sFGFR3 restableció una respuesta hepática normal en ratones *Fgfr3ach/+* tratados (figura 4E) y no se observaron nódulos.

La tasa metabólica de energía basal de ratones Fgfr3ach/+ se evaluó mediante calorimetría indirecta. Descubrimos que mientras los animales WT magros alimentados con una dieta normal (ND) extraían energía de fuentes de
5 carbohidratos (cociente respiratorio RQ cerca de 1), los ratones transgénicos con acondroplasia, alimentados extraían su energía esencialmente de fuentes de lípidos (RQ cerca de 0.7) (figura 5A). En el episodio de ayuno, como se esperaba, ambos tipos de animales extrajeron su energía de las fuentes
10 de lípidos. Esta utilización preferencial de lípidos se confirmó mediante el cálculo de la oxidación de carbohidratos y lípidos, que fueron respectivamente más bajos y más altos en ratones Fgfr3ach/+ en comparación con animales WT (figura 5B). Durante un período de 24 horas, los ratones Fgfr3ach/+
15 tienden a comer constantemente no solo durante el período nocturno, sino que el gasto energético y la ingesta de alimentos no fueron significativamente diferentes entre ambos genotipos (figuras 7A-7D). Como se esperaba bajo HFD, todos los animales extrajeron su energía de fuentes de lípidos, lo
20 que condujo a índices similares de oxidación de carbohidratos y lípidos (figuras 5C-5D, figuras 7E-7H). De manera muy interesante, los animales Fgfr3ach/+ que recibieron tratamiento de sFGFR3 durante el período de crecimiento se comportaron como ratones WT no tratados después del destete
25 si se alimentaron con ND o HFD, que sugiere la restauración

del metabolismo de glucosa durante el período de tratamiento (figura 5A-5D y figuras 7A-7H).

Se pueden evaluar variaciones en la deposición de tejido adiposo en los diferentes sitios del cuerpo para
5 evaluar la gravedad de la obesidad en la acondroplasia. En comparación con las puntuaciones z de IMC y las mediciones de pliegues cutáneos, la proporción androide:ginoide está estrechamente relacionada con todos los factores de riesgo en niños con sobrepeso y obesidad. En la acondroplasia, los
10 niños muestran una proporción androide:ginoide más alta que se desarrolla muy temprano durante la infancia. Nuestros hallazgos en ratones *Fgfr3^{ach/+}* sugieren una predisposición a obesidad visceral preferencial en estos pacientes. En realidad, las células derivadas del linaje mesenquimatoso
15 parecían más propensas a la adipogénesis que las células aisladas de los animales WT y parecen involucrarse previamente en el proceso de diferenciación hacia los adipocitos. Además, se observó una distribución diferente de adipocitos con una mayor proporción de adipocitos pequeños en
20 el tejido adiposo subcutáneo de ratones *Fgfr3^{ach/+}* en comparación con los animales WT. El número de células grasas se establece durante la infancia y la adolescencia y permanece constante durante la edad adulta. La obesidad en pacientes con acondroplasia puede establecerse muy temprano
25 durante la infancia y se puede garantizar el monitoreo a

partir de los 4 a 8 años de edad utilizando, por ejemplo, escaneos DXA.

El desarrollo de una obesidad abdominal generalmente se considera el tipo de obesidad más perjudicial (Smith, J. Clin. Invest. 125: 1790-1792, 2015). Nuestros resultados sugieren que la obesidad abdominal es probablemente una consecuencia de la mutación que afecta a FGFR3. Actualmente, tres miembros de la familia FGF se han relacionado con la obesidad (Nies et al., Front. Endocrinol. (Lausanne) 6: 193, 2015): FGF1, FGF15/19 y FGF21. El FGF1 está regulado por PPAR γ y está notablemente altamente regulado en WAT (28). Se sabe que FGF1 promueve proliferación y diferenciación pre-adipocitos a través de señalización Erk1/2. También desencadena un efecto de disminución de sangre aguda que parece depender de la señalización de FGFR2 en WAT. FGF15/19 se considera como un regulador de las respuestas de alimentación. Se une al complejo receptor FGFR4/bklotho en la membrana celular de los hepatocitos, lo que finalmente conduce a la represión de gluconeogénesis (Tomlinson et al., Endocrinology 143: 1741-1747, 2002). FGF21 se une principalmente a FGFR1 y regula la respuesta de ayuno adaptativo a través de PPAR α (Kharitonov et al., J. Clin. Invest. 115: 1627-1635, 2005). En ratones *Fgfr3^{ach/+}*, la sobreexpresión de FGFR3^{ach} durante embriogénesis podría modificar la señalización de FGF en diferentes tipos de

células. De acuerdo con esto, se encontró que las células madre mesenquimales de ratones *Fgfr3ach/+* expresan altos niveles de FGFR3 en comparación con sus compañeros de camada WT. Del mismo modo, los ratones *Fgfr3ach/+* recién nacidos expresan niveles aumentados de FGFR2 y FGFR4 en AT e hígado. En conjunto, estos datos podrían explicar la baja glucemia asociada con la obesidad abdominal en ratones *Fgfr3ach/+*. En esta línea, también se observó que los pacientes incluso tienden a disminuir la glucemia e insulinemia en ayunas y ningún paciente tenía intolerancia a glucosa, lo que sugiere que podrían aplicarse en humanos mecanismos similares.

Se aplicó tratamiento de sFGFR3 inmediatamente después del nacimiento y evitó la mayoría de las complicaciones metabólicas, que incluye el desarrollo de obesidad abdominal. Los ratones tratados con *Fgfr3ach/+* no estaban protegidos contra la obesidad per se, sino que se comportan esencialmente como animales WT con el desarrollo de obesidad homogénea y la restauración de metabolismo de glucosa que conduce a resistencia a glucosa bajo HFD. Esto sugiere que, si se aplica temprano en la vida, el tratamiento podría revertir el efecto de la mutación *Fgfr3ach* en estos tejidos metabólicos atípicos.

En conclusión, nuestros datos establecen que el desarrollo de una obesidad no conforme es preferentemente abdominal y parece que se provoca por la mutación FGFR3.

Nuestros datos también indican que el tratamiento para pacientes acondroplásicos con deposición anormal de grasa visceral se puede aplicar a otras poblaciones de pacientes con deposición anormal de grasa visceral y condiciones derivadas de la misma. Los pacientes con trastornos de retraso de crecimiento esquelético se pueden tratar para controlar la deposición anormal de grasa visceral y las afecciones asociadas con la misma, por ejemplo, después de la conclusión del crecimiento óseo cuando los polipéptidos sFGFR3 no se considerarían una terapia relevante. Los pacientes también pueden beneficiarse de monitorización de comorbilidades de obesidad, tal como riesgos de diabetes y CVS.

Otras modalidades

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en la especificación anterior se incorporan en la presente como referencia en la misma medida como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específicamente e individualmente que se incorpora como referencia en su totalidad.

Varias modificaciones y variaciones de los métodos descritos, composiciones farmacéuticas y kits de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a modalidades específicas, se

entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y que la invención como se reivindica no se debe limitar indebidamente a estas modalidades específicas. En realidad, se propone que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a
5 cabo la invención que son evidentes para los expertos en la técnica estén dentro del alcance de la invención. Se propone que esta solicitud cubra cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención y que incluye estas desviaciones
10 de la presente descripción que entran dentro de la práctica habitual conocida dentro de la técnica a la que pertenece la invención y se pueden aplicar a las características esenciales en la presente expuestas anteriormente.

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención ofrece métodos para usar polipéptidos
sFGFR3 para tratar deposición anormal de grasa visceral y las
condiciones asociadas con deposición anormal de grasa
5 visceral.

10

15

20

25