República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020005459-3 A2

(22) Data do Depósito: 20/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2020

(54) Título: TRATAMENTO DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA VISCERAL ANORMAL USANDO POLIPEPTÍDEOS DE RECEPTOR 3 DE FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO SOLÚVEL (SFGFR3)

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; A61K 38/22; A61P 3/04; A61P 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 20/09/2017 US 62/561,140.

(71) Depositante(es): PFIZER INC.; INSERM(INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE); UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR; CENTRE NATIONAL RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

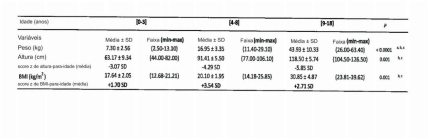
(72) Inventor(es): ELVIRE GOUZE; STÉPHANIE GARCIA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018075471 de 20/09/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/057820 de 28/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 19/03/2020

(57) Resumo: A invenção caracteriza métodos de usar polipeptídeos de sFGFR3 para tratar deposição de gordura visceral anormal e as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"TRATAMENTO DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA VISCERAL ANORMAL USANDO POLIPEPTÍDEOS DE RECEPTOR 3 DE FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO SOLÚVEL (SFGFR3)".**

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[001] Acondroplasia, a forma mais comum de nanismo de membros curtos, é uma doença genética rara para a qual não existe nenhuma cura. Em muitos pacientes, uma substituição de G380R no domínio de transmembrana do receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) (Fgfr3ach) resulta em um ganho de função, prolongando a sinalização de MAPK intracelular. Na placa de crescimento, a sinalização de MAPK é inibitória e sua ativação constitutiva subsequente resulta na inibição de proliferação e diferenciação de condrócitos. Células que expressam o receptor mutante não amadurecem e não são substituídas por matriz óssea mineralizada, finalmente resultando em ossos anormalmente curtos.

[002] Acondroplasia também é caracterizada por obesidade precoce que representa um problema de saúde maior nestes pacientes, afetando aproximadamente 50 % de pacientes durante a infância. A obesidade aumenta a morbidez associada com lordose lombar, bem como o impacto físico de complicações ortopédicas existentes, aumentando, por exemplo, o peso suportado nos joelhos já frágeis. Ela também pode aumentar o risco de complicações sérias tais como riscos cardiovasculares, apneia obstrutiva do sono ou doença pulmonar restritiva. A causa desta suscetibilidade aumentada à obesidade em pacientes com acondroplasia não é conhecida, mas não parece estar ligada à disfunção hormonal ou neurológica que pode levar à desregulação do apetite, tal como hiperfagia.

[003] Pacientes acondroplásicos obesos também podem sofrer de complicações metabólicas associadas, tais como dislipidemia, bai-

xos níveis de insulina e desregulação da glicose. Não está claro se estas complicações são isoladas e relacionadas a fatores exógenos, tais como consumo calórico excessivo e/ou atividade física diminuída ou se elas, de fato, refletem um defeito subjacente na acondroplasia.

[004] A deposição de gordura anormal, e, mais particularmente, deposição de gordura visceral anormal, na população geral também é associada com o desenvolvimento de doenças específicas, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas, pulmonares, reprodutivas e neurológicas. Existe uma necessidade de terapias para tratar ou prevenir o desenvolvimento de deposição de gordura visceral anormal e suas doenças associadas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Em um primeiro aspecto, o pedido descreve um método de tratar ou reduzir a deposição de gordura anormal (por exemplo, deposição de gordura visceral) em um sujeito (por exemplo, um ser humano, tal como um feto, neonato, infante, criança, adolescente ou adulto) em necessidade deste administrando-se um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira que contém o polinucleotídeo que codifica o mesmo ao sujeito. Em várias modalidades, a deposição de gordura visceral anormal é associada com ou adjacente a um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestinos, órgãos reprodutivos e vesícula biliar; ou a deposição de gordura visceral anormal causa doença em um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, pulmões, traqueia, fígado, pâncreas, cérebro, órgãos reprodutivos, artérias e vesícula biliar; ou a deposição de gordura visceral anormal é causada por disfunção em um órgão endócrino, tal como uma glândula adrenal, uma glândula pituitária ou um órgão reprodutivo, tal como um ovário. O método pode resultar na redução ou eliminação ou risco diminuído de de-

senvolvimento, de uma ou mais condições associadas com a distribuição de gordura anormal, tal como apneia obstrutiva do sono, doença pulmonar, doença cardiovascular, doença metabólica, doença neurológica, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, demência, infertilidade, irregularidades menstruais, desregulação de insulina e desregulação da glicose. Em particular, a dislipidemia é um nível anormal de um ou mais de triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDLs), lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e colesterol; a doença cardiovascular é doença cardíaca ou acidente vascular cerebral; a doença pulmonar é asma e doença pulmonar restritiva; a doença neurológica é demência ou doença de Alzheimer; a doença metabólica é diabete tipo 2, intolerância à glicose, esteatose hepática não alcoólica e toxicidade hepática; a desregulação de insulina é resistência à insulina.

[006] Em uma modalidade, o sujeito tendo deposição de gordura anormal não está com sobrepeso, carece de deposição de gordura subcutânea substancial e/ou não pode exibir deposição de gordura anormal substancial fora do abdômen. A deposição de gordura anormal pode ser determinada usando uma técnica antropométrica (por exemplo, índice de massa corpórea (IMC) ou razão de gordura androide:ginoide) ou imagiologia (por exemplo, tomografia computadorizada (CT), imagiologia de ressonância magnética (MRI) e absorciometria de raio X de dupla energia (DXA), métodos que podem detectar a distribuição de gordura anormal na ausência de outros fenótipos adiposos.

[007] Em outras modalidades, o sujeito pode ter um transtorno de retardo do crescimento esquelético, tal como uma doença esquelética relacionada a FGFR3 (por exemplo, uma doença esquelética relacionada a FGFR3 que é causada por expressão no paciente de uma variante de FGFR3 que exibe superativação dependente de ligante, tal como uma variante de FGFR3 tendo uma substituição de aminoácido

de um resíduo de glicina com um resíduo de arginina na posição 358 (G358R), como apresentado na SEQ ID NO: 9). A doença esquelética relacionada a FGFR3 pode incluir, por exemplo, acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose (por exemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon e síndrome Crouzonodermoesquelética) e camptodactilia, estatura alta e síndrome de perda auditiva (CATSHL). O paciente com um transtorno de retardo do crescimento esquelético pode ter um ou mais sintomas do transtorno de retardo do crescimento esquelético selecionados do grupo consistindo em membros curtos, tronco curto, pernas tortas, uma marcha miopática, malformações cranianas, crânio em folha de trevo, craniossinostose, ossos vormianos, anomalias das mãos, anomalias dos pés, polegar do caroneiro e anomalias torácicas. Excluído dos métodos descritos aqui pode ser um sujeito com um transtorno de retardo do crescimento esquelético, tais como aqueles descrito acima, por exemplo, acondroplasia, depois da cessação do crescimento ósseo no paciente (por exemplo, um sujeito fetal, neonatal, infante, criança e/ou adolescente).

[008] Em uma modalidade alternativa, o paciente não tem um transtorno de retardo do crescimento esquelético, mas pode ser caracterizado como tendo obesidade, síndrome do ovário policístico ou uma forma de hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

[009] Em outras modalidades, o sFGFR3 tem pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente (por exemplo, 100 a 370 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular do polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente ou menos do que 350 aminoácidos do domínio extracelular do polipeptí-

deo de FGFR3 que ocorre naturalmente). O polipeptídeo de sFGFR3 pode ter um domínio 1, 2 e/ou 3 do tipo C2 semelhante a Ig do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente. O polipeptídeo de sFGFR3, em particular, carece de um peptídeo de sinal e/ou um domínio de transmembrana, tal como o peptídeo de sinal e/ou domínio de transmembrana de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente. Alternativamente, o polipeptídeo de sFGFR3 é um polipeptídeo maduro. O polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente pode ter a sequência de aminoácido do Nº de Acesso no Genbank NP_000133.

[010] O polipeptídeo de sFGFR3 pode ter 400 aminoácidos consecutivos ou menos de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente (por exemplo, entre 5 e 399 aminoácidos consecutivos, tal como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15 ou menos aminoácidos consecutivos, do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente). O polipeptídeo de sFGFR3 pode ter uma sequência de aminoácido com pelo menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 % ou 99 % de identidade de sequência aos aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8 (por exemplo, o polipeptídeo de sFGFR3 pode ter aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8). Em várias modalidades, o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio de tirosina cinase de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente, carece de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente ou é menos do que 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150 ou 100 aminoácidos em comprimento. Em outras modalidades, o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma sequência de aminoácido com pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência) aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8. Ainda em outras modalidades, o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma sequência de aminoácido com pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 % a 100 %

de identidade de sequência) à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7. O polipeptídeo de sFGFR3 também pode ter um peptídeo de sinal, tal como um peptídeo de sinal de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente (por exemplo, um peptídeo de sinal tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21). O polipeptídeo de sFGFR3 também pode ter um polipeptídeo heterólogo (por exemplo, uma região do fragmento cristalizável de uma imunoglobulina (região Fc) ou albumina sérica humana (HSA)).

[011] Ainda em outras modalidades, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 pode ter uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 85 % e até 100 % de identidade de sequência a sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18 (por exemplo, o polinucleotídeo pode consistir na sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18). O polinucleotídeo pode ser um polinucleotídeo isolado e/ou pode ser em um vetor (por exemplo, um vetor selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral e um vetor de fago). O vetor pode estar em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula hospedeira isolada, tal como uma célula hospedeira do sujeito ou uma célula HEK 293 ou célula CHO). A célula hospedeira também pode ser transformada com o polinucleotídeo de codificação de sFGFR3.

[012] Em outras modalidades, o polipeptídeo de sFGFR3 se liga a um fator de crescimento de fibroblasto (FGF), em que o FGF é selecionado do grupo consistindo em fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF1), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), fator de crescimento de fibroblasto 9 (FGF9), fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18), fator de crescimento de fibroblasto 19 (FGF19), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23). A ligação ao FGF pode ser caracterizada por uma constante

de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de 0,2 nM a cerca de 20 nM ou por uma K_d de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM (por exemplo, a K_d é cerca de 1 nm, cerca de 2 nm, cerca de 3 nm, cerca de 4 nm, cerca de 5 nm, cerca de 6 nm, cerca de 7 nm, cerca de 8 nm, cerca de 9 nm ou cerca de 10 nm).

[013] Um aspecto do tratamento envolve administrar um polipeptídeo de sFGFR3, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira contendo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 a um sujeito, por exemplo, um sujeito humano, tal como um sujeito humano ingênuo que ainda não foi tratado com um polipeptídeo de sFGFR3). O polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado em uma composição contendo um excipiente, portador ou diluente farmaceuticamente aceitável. Doses possíveis são de cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 30 mg/kg (por exemplo, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg). A administração pode ser diária, semanal ou mensal. A periodicidade da dosagem pode ser sete vezes por semana, seis vezes por semana, cinco vezes por semana, quatro vezes por semana, três vezes por semana, duas vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas ou uma vez por mês. A via de dosagem pode ser subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, parenteral, enteral ou tópica. A administração repetida pode ser realizada.

[014] Em outras modalidades, o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma meia-vida *in vivo* entre cerca de 2 horas a cerca de 25 horas.

[015] Um segundo aspecto da invenção caracteriza uma composição contendo um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira contendo o polinucleotídeo para tratar ou reduzir a distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste (por exemplo, um sujeito humano), por

exemplo, de acordo com o método do primeiro aspecto da invenção.

[016] Um terceiro aspecto da invenção caracteriza o uso de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira contendo um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 na fabricação de um medicamento para tratar ou reduzir a distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste (por exemplo, um sujeito humano), por exemplo, de acordo com o método do primeiro aspecto da invenção.

DEFINIÇÕES

[017] Como usado aqui, "um" e "uma" significa "pelo menos um" ou "um ou mais" a menos que de outro modo indicado. Além disso, as formas no singular "um", "uma" e "o", "a" incluem referentes no plural a menos que o contexto claramente dite de outro modo.

[018] A frase "deposição de gordura visceral anormal" se refere a um nível de deposição de gordura no omento, mesentério, retroperitônio e pericárdio, que é maior do que um nível de deposição de gordura observada em um sujeito normal, como determinado por técnicas antropométricas ou técnicas de imagiologia (consultar, para exemplo, "Methods of Diagnosis, *infra*., para a enumeração de valores para cada técnica definindo um corte distinguindo a deposição de gordura visceral normal da anormal). Por exemplo, sujeitos com deposição de gordura visceral anormal são aqueles que exibem um valor de deposição de gordura visceral que é igual a ou maior do que 10 % ou acima (por exemplo, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 500 %, 750 %, 1000 % ou mais acima) um corte para a deposição de gordura visceral em relação àquele de um sujeito normal. Comumente, a deposição de gordura visceral anormal é associada com um subconjunto de pacientes obesos, por exemplo, aqueles com um IMC >30 kg/m^2. A deposição de gordura visceral anormal pode re-

sultar de uma variedade de condições. Estas incluem, por exemplo, síndromes de retardo do crescimento esquelético (por exemplo, acondroplasia), hipercortisolismo (por exemplo, doença de Cushing) e síndrome do ovário policístico.

[019] Como usado aqui, "cerca de" se refere a uma quantidade que é ± 10 % do valor relatado e é preferivelmente ± 5 % do valor relatado ou mais preferivelmente ± 2 % do valor relatado. Por exemplo, o termo "cerca de" pode ser usado para modificar todas as dosagens ou faixas relatadas aqui em ± 10 % dos valores relatados ou pontos de extremidade da faixa.

[020] A frase "técnicas antropométricas" se refere a medições da composição corporal com base na altura, peso, circunferência da cintura e circunferência do quadril, incluindo índice de massa corpórea (IMC), razão de gordura androide:ginoide, circunferência da cintura e diâmetro sagital (SD); consultar, para exemplo, Shuster *et al*., *Br. J. Radiol.* 85(1009):1 - 10, 2012).

[021] A frase "doença cardiovascular" se refere a doenças do coração e vasos sanguíneos, em particular, aterosclerose, infarto do miocárdio e hipertensão.

[022] A frase "condições associadas com deposição de gordura visceral anormal" se refere a doenças observadas em pacientes cuja deposição de gordura visceral é mostrada como sendo anormal em relação aos pacientes normais. Em particular, estas condições incluem doença cardiovascular, doença pulmonar, doença metabólica, doença reprodutiva e doença neurológica.

[023] O termo "domínio" se refere a uma região conservada da sequência de aminoácido de um polipeptídeo (por exemplo, um polipeptídeo de FGFR3) tendo uma estrutura e/ou função identificáveis dentro do polipeptídeo. Um domínio pode variar em comprimento de, por exemplo, cerca de 20 aminoácidos a cerca de 600 aminoácidos.

Domínios exemplares incluem os domínios de imunoglobulina de um FGFR3 (por exemplo, domínio 1 do tipo C2 semelhante à Ig, domínio 2 do tipo C2 semelhante à Ig e domínio 3 do tipo C2 semelhante à Ig), o domínio extracelular (ECD) de um FGFR3, o domínio intracelular (ICD) de um FGFR3 ou o domínio de transmembrana (TM) de um FGFR3, tal como um FGFR3 tendo a sequência apresentada na SEQ ID NO: 8).

[024] O termo "dosagem" se refere a uma quantidade determinada de um agente ativo (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante deste tendo pelo menos 85 % a 100 % de identidade de sequência a esta) calculada para produzir um efeito terapêutico desejado (por exemplo, tratamento de deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral) quando o agente ativo é administrado a um paciente (por exemplo, um paciente tendo deposição de gordura visceral anormal ou uma condição associada com a deposição de gordura visceral). Uma dosagem pode ser definida em termos de uma quantidade definida do agente ativo ou uma quantidade definida ligada com uma frequência de administração particular. Uma forma de dosagem pode incluir um polipeptídeo de sFGFR3 ou fragmento deste em associação com qualquer excipiente, portador ou diluente farmacêutico adequado.

[025] Os termos "quantidade eficaz", "quantidade eficaz para" e "quantidade terapeuticamente eficaz" se referem a uma quantidade de um polipeptídeo de sFGFR3, um vetor que codifica um sFGR3 e/ou uma composição de sFGFR3 que é suficiente para produzir um resultado desejado, por exemplo, deposição de gordura anormal diminuída, deposição de gordura visceral anormal ou uma diminuição nos sintomas associados com condições ligadas à deposição de gordura visceral anormal.

[026] Os termos "domínio extracelular" e "ECD" se referem à porção de um polipeptídeo de FGFR3 que se estende além do domínio de transmembrana no espaço extracelular. O ECD medeia a ligação de um FGFR3 a um ou mais fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs). Por exemplo, um ECD inclui os domínios 1 a 3 do tipo C2 semelhante à Ig de um polipeptídeo de FGFR3. Em particular, o ECD inclui o domínio 1 do tipo C2 semelhante à Ig de um polipeptídeo de FGFR3 do tipo selvagem (wt), o domínio 2 do tipo C2 semelhante à Ig de um polipeptídeo de FGFR3 do tipo selvagem (wt) e/ou o domínio 3 do tipo C2 semelhante à Ig de um polipeptídeo de FGFR3 wt. Um ECD de um FGFR3 também pode incluir um fragmento do domínio do tipo C2 semelhante à Ig de FGFR3 do tipo selvagem por exemplo.

[027] A frase "deposição de gordura" se refere à deposição de gordura visceral ou deposição de gordura subcutânea.

[028] O termo "doença esquelética relacionada a FGFR3", como usado aqui, se refere a uma doença esquelética que é causada por um aumento anormal na ativação de FGFR3, tal como por expressão de um mutante de ganho de função do FGFR3. A frase "mutante de ganho de função do FGFR3" se refere a um mutante do FGFR3 que exibe uma atividade biológica, tal como desencadeando sinalização a jusante, que é mais alta do que a atividade biológica do FGFR3 do tipo selvagem correspondente (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8) na presença de um ligante de FGF. Doenças esqueléticas relacionadas a FGFR3 podem incluir uma doença hereditária ou uma doença esporádica. Doenças esqueléticas relacionadas a FGFR3 exemplares incluem, mas não são limitadas a, acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDAN), hipocondroplasia, uma craniossinostose (por exemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crou-

zon e síndrome Crouzonodermoesquelética) e camptodactilia, estatura alta e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

[029] Os termos "fator de crescimento de fibroblasto" e "FGF" se referem a um membro da família de FGF, que inclui moléculas de sinalização estruturalmente relacionadas envolvidas em vários processos metabólicos, incluindo vias de sinalização endócrinas, desenvolvimento, cura do ferimento e angiogênese. FGFs desempenham papéis chaves na proliferação e diferenciação de uma faixa ampla de tipos de células e tecidos. O termo preferivelmente se refere a FGF1, FGF2, FGF9, FGF 10, FGF18, FGF19, FGF21 e FGF23, que mostraram se ligar a FGFR3. Por exemplo, FGFs podem incluir FGF1 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 26), FGF2 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 27), FGF9 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 28), FGF10 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 40), FGF18 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 29), FGF19 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 30), FGF21 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 31) e FGF23 humano (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 41).

[030] Os termos "receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto", "FGFR3" ou "receptor FGFR3", como usado aqui, se referem a um polipeptídeo que especificamente se liga a um ou mais FGFs (por exemplo, FGF1, FGF2, FGF9, FGF10, FGF18, FGF19, FGF 21 e/ou FGF23). O gene de FGFR3 humano, que é localizado no braço curto distal do cromossomo 4, codifica um precursor de proteína de 806 aminoácidos (precursor da isoforma 1 do receptor 3 de fator de cres-

cimento de fibroblasto), que contém 19 exons e inclui um peptídeo de sinal (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21). Mutações na sequência de aminoácido de FGFR3 que levam a transtornos de crescimento esquelético, (por exemplo, acondroplasia), incluem, por exemplo, a substituição de um resíduo de glicina na posição 358 com um resíduo de arginina (isto é, G358R; SEQ ID NO: 9). O gene de FGFR3 humano que ocorre naturalmente tem uma sequência de nucleotídeo como mostrado no Número de Acesso no Genbank NM_000142,4 e a proteína de FGFR3 que ocorre naturalmente humana tem uma sequência de aminoácido como mostrado no Número de Acesso no Genbank NP_000133, aqui representada pela SEQ ID NO: 8. O FGFR3 do tipo selvagem (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8) consiste em um domínio de membrana semelhante à imunoglobulina extracelular incluindo os domínios 1 a 3 do tipo C2 semelhante à Ig, um domínio de transmembrana e um domínio intracelular. FGFR3s podem incluir fragmentos e/ou variantes (por exemplo, variantes de *splice*, tais como variantes de *splice* utilizando exon 8 alternado ao invés do exon 9) do FGFR3 do tipo selvagem, de tamanho natural.

[031] Os termos "fragmento" e "porção" se referem a uma parte de um todo, tal como um polipeptídeo ou molécula de ácido nucleico que contém, preferivelmente, pelo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais do comprimento inteiro da molécula de ácido nucleico ou polipeptídeo de referência ou um domínio destes (por exemplo, o ECD, ICD ou TM de um polipeptídeo de sFGFR3). Um fragmento ou porção pode conter, por exemplo, 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, 390, 400, 500, 600, 700 ou mais resí-

duos de aminoácido consecutivos, até o comprimento inteiro do polipeptídeo de referência. Por exemplo, um fragmento de FGFR3 pode incluir qualquer polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 5 aminoácidos consecutivos a cerca de 300 aminoácidos consecutivos, inclusive dos pontos de extremidade, por exemplo, pelo menos cerca de 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 ou 300 aminoácidos consecutivos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1 a 8.

[032] A frase "desregulação da glicose" se refere a um nível de glicose no sangue que está acima ou abaixo de uma faixa normal aceitável.

[033] Como usado aqui, o termo "célula hospedeira" se refere a um veículo que inclui os componentes celulares necessários, por exemplo, organelas, necessários para expressar um polipeptídeo de sFGFR3 a partir de um polinucleotídeo correspondente. A sequência de ácido nucleico do polinucleotídeo é tipicamente incluída em um vetor de ácido nucleico (por exemplo, um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral ou um vetor de fago) que pode ser introduzido na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio e microinjeção direta). Uma célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, por exemplo, uma célula bacteriana ou uma célula de arquea ou uma célula eucariótica, por exemplo, uma célula mamífera (por exemplo, uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou uma 293 de Rim Embrionário Humano (HEK 293)). Preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula mamífera, tal como uma célula CHO.

[034] A frase "técnicas de imagiologia" se refere a métodos de criar representações visuais do interior de um corpo para o propósito

de análise clínica e intervenção médica. Exemplos de técnicas de imagiologia incluem, por exemplo, absorciometria de raio X de dupla energia (DXA) produzindo índice de massa gorda, imagiologia em seção transversal, tal como tomografia computadorizada (CT) e imagiologia de ressonância magnética (MRI), produzindo uma área de gordura visceral em cm^2 em um nível específico da coluna lombar (consultar, para exemplo, Shuster *et al*., *supra)*.

[035] A frase "desregulação de insulina" se refere a um nível de insulina no sangue que está acima ou abaixo de uma faixa normal aceitável.

[036] Por "isolado" significa separado, recuperado ou purificado a partir de seu ambiente natural. Por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 isolado (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID Nos: 1 a 7 ou uma variante deste tendo pelo menos cerca de 85 % até cerca de 100 % de identidade de sequência a este) pode ser caracterizado por um certo grau de pureza depois de isolar o polipeptídeo de sFGFR3, por exemplo, do meio de cultura celular. Um polipeptídeo de sFGFR3 isolado pode ser pelo menos 75 % puro, tal que o polinucleotídeo de sFGFR3 constitui pelo menos 75 % em peso do material total (por exemplo, polipeptídeos, polinucleotídeos, fragmentos celulares e contaminantes ambientais) presentes na preparação (por exemplo, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 99 % ou pelo menos 99,5 % em peso do material total presente na preparação). Do mesmo modo, um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polinucleotídeo tendo a sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18 ou uma variante deste tendo pelo menos cerca de 85 % até cerca de 100 % de identidade de sequência a

este) ou uma célula hospedeira isolada (por exemplo, célula CHO, uma célula HEK 293, célula L, célula C127, célula 3T3, célula BHK, célula COS-7 ou uma célula de um sujeito) contendo o polinucleotídeo pode ser pelo menos 75 % pura, tal que o polinucleotídeo ou célula hospedeira constitui pelo menos 75 % em peso do material total (por exemplo, polipeptídeos, polinucleotídeos, fragmentos celulares e contaminantes ambientais) presente na preparação (por exemplo, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 99 % ou pelo menos 99,5 % em peso do material total presente na preparação).

[037] A frase "doença metabólica" se refere a transtornos de reações químicas que ajudam com o processamento energético, em particular dislipidemia, desregulação de insulina, desregulação da glicose, esteatose hepática não alcoólica e toxicidade hepática.

[038] A frase "doença neurológica" se refere a doenças do cérebro ou nervos, em particular, demência e acidente vascular cerebral.

[039] Os termos "administração parenteral", "administrado parenteralmente" e outras frases gramaticalmente equivalentes, como usado aqui, se referem a um modo de administração de composições incluindo um polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 (com ou sem um peptídeo de sinal) exceto administração enteral e tópica, usualmente por injeção e incluem, sem limitação, injeção e infusão subcutâneas, intradérmicas, intravenosas, intranasais, intraoculares, pulmonares, intramusculares, intra-arteriais, intratecais, intracapsulares, intraorbitárias, intracardíacas, intradérmicas, intrapulmonares, intraperitoneais, transtraqueais, subcuticulares, intra-articulares, subcapsulares, subaracnoides, intraespinhais, epidurais, intracerebrais, intracranianas, intracaróticas e intraesternais.

[040] Os termos "paciente" e "sujeito" se referem a um mamífero, incluindo, mas não limitado a, um ser humano (por exemplo, um ser humano tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal) ou um mamífero não humano (por exemplo, um mamífero não humano tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal, tal como um bovino, equino, canino, ovino ou felino. Preferivelmente, o paciente é um ser humano tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal), particularmente um feto, um neonato, um infante, uma criança, um adolescente ou um adulto tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal.

[041] Por "composição farmacêutica" significa uma composição contendo um agente ativo, tal como um sFGFR3, formulado com pelo menos um excipiente, portador ou diluente farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode ser fabricada ou vendida com a aprovação de uma agência reguladora governamental como parte de um regime terapêutico para o tratamento de uma doença ou evento (por exemplo, deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal) em um paciente (por exemplo, um paciente tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal). As composições farmacêuticas podem ser formuladas, por exemplo, para administração parenteral, tal como para administração subcutânea (por exemplo, por injeção subcutânea) ou administração intravenosa (por exemplo, como uma solução estéril livre de êm-

bolos particulados e em um sistema de solvente adequado para uso intravenoso) ou para administração oral (por exemplo, como um tablete, cápsula, comprimido, gélula ou xarope).

[042] Por "diluente, excipiente, portador ou adjuvante farmaceuticamente aceitável" significa um diluente, excipiente, portador ou adjuvante, respectivamente que é fisiologicamente aceitável ao sujeito (por exemplo, um ser humano) enquanto mantendo as propriedades terapêuticas da composição farmacêutica (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, com a qual ele é administrado. Um portador farmaceuticamente aceitável exemplar é solução salina fisiológica. Outros diluentes, excipientes, portadores ou adjuvantes fisiologicamente aceitáveis e suas formulações são conhecidos a uma pessoa habilitada na técnica.

[043] "Polinucleotídeo" e "molécula de ácido nucleico", como usado permutavelmente aqui, se refere a polímeros de nucleotídeos de qualquer comprimento e incluem DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos modificados ou bases e/ou análogos destes ou qualquer substrato que possa ser incorporado em um polímero por DNA ou RNA polimerase ou por uma reação sintética. Um polinucleotídeo pode incluir nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e análogos destes. Se presente, a modificação à estrutura do nucleotídeo pode ser comunicada antes ou depois da montagem do polímero. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes que não de nucleotídeo. Um polinucleotídeo pode ser modificado ainda depois da síntese, tal como por conjugação com um rótulo.

[044] A frase "doença pulmonar" se refere a doenças de troca de ar, em particular, apneia obstrutiva do sono, doença pulmonar restritiva e asma.

[045] A frase "doença reprodutiva" se refere a doenças do sistema

reprodutivo, em particular, infertilidade e irregularidades menstruais.

[046] Como usado aqui, o termo "identidade de sequência" se refere à porcentagem de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência candidata, por exemplo, um polipeptídeo de FGFR3, que são idênticos aos resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência de referência, por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 do tipo selvagem (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8) ou um polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7) depois de alinhar as sequências e introduzir intervalos, se necessário, para obter a porcentagem de identidade máxima (por exemplo, intervalos podem ser introduzidos em uma ou ambas das sequências candidatas e de referência para alinhamento ideal e sequências não homólogas podem ser desconsideradas para propósitos de comparação). O alinhamento para propósitos de determinar a porcentagem de identidade pode ser obtida em vários modos que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, usando programas de computador publicamente disponíveis, tais como os softwares BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL ou Megalign (DNASTAR). Aqueles habilitados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter alinhamento máximo sobre o tamanho natural das sequências sendo comparadas. Por exemplo, a porcentagem de identidade de sequência de aminoácido (ou ácido nucleico) de uma sequência candidata dada a, com ou contra uma sequência de referência dada (que pode ser alternativamente expressada como uma sequência candidata dada que tem ou inclui uma certa porcentagem de identidade de sequência de aminoácido (ou ácido nucleico) a, com ou contra

uma sequência de referência dada) é calculada como segue: 100 x (fração de A/B)onde A é o número de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) contado como idêntico no alinhamento da sequência candidata e da sequência de referência e onde B é o número total de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) na sequência de referência. Em particular, uma sequência de referência alinhada para comparação com uma sequência candidata pode mostrar que a sequência candidata exibe de, por exemplo, 50 % a 100 % de identidade através do tamanho natural da sequência candidata ou uma porção selecionada de resíduos de aminoácido (ou ácido nucleico) contíguos da sequência candidata. O comprimento da sequência candidata alinhada para propósito de comparação é pelo menos 30 %, por exemplo, pelo menos 40 %, por exemplo, pelo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou 100 % do comprimento da sequência de referência. Quando uma posição na sequência candidata é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido (ou ácido nucleico) como a posição correspondente na sequência de referência, então as moléculas são idênticas nesta posição.

[047] Por "peptídeo de sinal" significa um peptídeo curto (por exemplo, 5 a 30 aminoácidos em comprimento, tal como 22 aminoácidos em comprimento) no término N de um polipeptídeo que direciona um polipeptídeo para a via secretória (por exemplo, o espaço extracelular). O peptídeo de sinal é tipicamente clivado durante a secreção do polipeptídeo. A sequência de sinal pode direcionar o polipeptídeo para um compartimento intracelular ou organela, por exemplo, o complexo de Golgi. Uma sequência de sinal pode ser identificada por homologia ou atividade biológica, a um peptídeo com a função conhecida de alvejar um polipeptídeo a uma região particular da célula. Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode identificar um peptídeo de sinal usando-se software prontamente disponível (por exemplo, os programas Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer

Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST ou PILEUP/PRETTYBOX). Um peptídeo de sinal pode ser um, isto é, por exemplo, substancialmente idêntico à sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

[048] O termo "transtorno de retardo do crescimento esquelético", como usado aqui, se refere a uma doença esquelética caracterizada por deformidades e/ou malformações dos ossos. Estes transtornos incluem, mas não se limitam a, transtornos de retardo do crescimento esquelético causados por fraturas da placa de crescimento (fisário), transtornos de retardo do crescimento esquelético idiopáticos ou doenças esqueléticas relacionadas a FGFR3. Em particular, um paciente tendo um transtorno de retardo do crescimento esquelético (por exemplo, acondroplasia) pode ter ossos que são mais curtos do que os ossos de um paciente saudável. Por exemplo, o transtorno de retardo do crescimento esquelético pode incluir uma displasia esquelética, por exemplo, acondroplasia, acondroplasia homozigótica, acondroplasia heterozigótica, acondrogênese, acrodisostose, displasia acromesomélica, atelosteogênese, displasia camptomélica, condrodisplasia punctata, tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, disostose cleidocraniana, fêmur curto congênito, craniossinostose (por exemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome de Pfeiffer ou síndrome Crouzonodermoesquelética), dactilia, braquidactilia, camptodactilia, polidactilia, sindactilia, displasia diastrófica, nanismo, displasia dissegmentar, encondromatose, fibrocondrogênese, displasia fibrosa, exostoses múltiplas hereditárias, hipocondroplasia, hipofosfatasia, raquitismo hipofosfatômico, síndrome de Jaffe-Lichtenstein, displasia de Kniest, síndrome de Kniest, displasia mesomélica do tipo de Langer, síndrome de Marfan, síndrome de McCune-Albright, micromelia, displasia metafisária, displasia metafisária do tipo de Jansen, displasia metatrófica, síndrome de Morquio, dis-

plasia mesomélica do tipo de Nievergelt, neurofibromatose, osteoartrite, osteocondrodisplasia, osteogênese imperfeita, tipo letal perinatal de osteogênese imperfeita, osteopetrose, osteopoicilose, disostose periférica, síndrome de Reinhardt, síndrome de Roberts, síndrome de Robinow, síndromes de polidactilia de costela curta, estatura curta, displasia congênita espondiloepifisária e displasia espondiloepimetafisária.

[049] Os termos "receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel", "FGFR3 solúvel" e "sFGFR3" se referem a um FGFR3 que é caracterizada pela ausência ou interrupção funcional de todo ou uma parte substancial do domínio de transmembrana e qualquer porção de polipeptídeo que ancoraria o polipeptídeo de FGFR3 a uma membrana celular (por exemplo, um domínio de tirosina cinase). Um polipeptídeo de sFGFR3 é uma forma não ligada à membrana de um polipeptídeo de FGFR3. Assim, um polipeptídeo de sFGFR3 pode incluir uma supressão de uma porção ou todos os resíduos de aminoácido do domínio de transmembrana de uma sequência de polipeptídeo de FGFR3 do tipo selvagem (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8). O polipeptídeo de sFGFR3 pode incluir ainda supressões do domínio intracelular do polipeptídeo de FGFR3 do tipo selvagem.

[050] Polipeptídeos de sFGFR3 exemplares podem incluir, mas não são limitados a, pelo menos os 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 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 ou 1 a 300 ou 1 a 301 das SEQ ID NOs: 1 a 8. Polipeptídeos de sFGFR3 podem incluir qualquer polipeptídeo tendo pelo menos 50 % (por exemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais) de identidade de sequência a qualquer um destes polipeptídeos de

sFGFR3 das SEQ ID NOs: 1 a 8. Adicionalmente, polipeptídeos de sFGFR3 exemplares podem incluir, mas não são limitados a, pelo menos os 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 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 ou 1 a 348 das SEQ ID NOs: 1 a 8. Polipeptídeos de sFGFR3 podem incluir qualquer polipeptídeo tendo pelo menos 50 % (por exemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais) de identidade de sequência a qualquer um destes polipeptídeos de sFGFR3 tendo a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 1 a 8. Qualquer um dos polipeptídeos de sFGFR3 acima ou variantes destes pode incluir opcionalmente um peptídeo de sinal na posição N-terminal, tais como os aminoácidos 1 a 22 da SEQ ID NO: 21 (MGAPACALALCVAVAIVAGASS) ou aminoácidos 1 a 19 da SEQ ID NO: 43 (por exemplo, MMSFVSLLLVGILFHATQA).

[051] A frase "deposição de gordura subcutânea" se refere à deposição de gordura na hipoderme.

[052] Por "tratando" e "tratamento" significa uma redução (por exemplo, em pelo menos cerca de 10 %, cerca de 15 %, cerca de 20 %, cerca de 25 %, cerca de 30 %, cerca de 35 %, cerca de 40 %, cerca de 45 %, cerca de 50 %, cerca de 60 %, cerca de 70 %, cerca de 80 %, cerca de 90 %, cerca de 95 %, cerca de 99 % ou ainda 100 %) na deposição de gordura anormal ou deposição de gordura visceral anormal ou na progressão, severidade ou frequência de uma ou mais ou uma condição associada com a deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, doença cardiovascular, doença pulmonar, doença metabólica ou doença neurológica) em um paciente (por exemplo, um ser humano, tal como um feto, um neonato, um infante, uma

criança, um adolescente ou um adulto). O tratamento pode ocorrer por um período de tratamento, em que um polipeptídeo de sFGFR3 é administrado por um período de tempo (por exemplo, dias, meses, anos ou mais) para tratar um paciente (por exemplo, um ser humano, tal como um feto, um neonato, um infante, uma criança, um adolescente ou um adulto) tendo deposição de gordura anormal, deposição de gordura visceral anormal ou uma condição associada com a deposição de gordura visceral anormal. Sintomas exemplares de associada com a deposição de gordura visceral anormal em um paciente com acondroplasia que pode ser tratado com um sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante deste) incluem, mas não são limitados a, aterosclerose, hipertensão, desregulação de lipídeo, apneia obstrutiva do sono, desregulação da glicose ou desregulação de insulina (por exemplo, resistência à insulina).

[053] O termo "forma(s) de dosagem unitária" se refere a unidade(s) fisicamente separada(s) adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos e outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com qualquer excipiente, portador ou diluente farmacêutico adequado.

[054] O termo "variante", com respeito a um polipeptídeo, se refere a um polipeptídeo (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, com ou sem um peptídeo de sinal) que difere em uma ou mais mudanças na sequência de aminoácido do polipeptídeo do qual a variante é derivada (por exemplo, o polipeptídeo de referência, tal como, por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7). O termo "variante", com respeito a um polinucleotídeo, se refere a um polinucleotídeo que difere em uma ou mais mudanças na sequência de ácido nucleico do

polinucleotídeo do qual a variante é derivada (por exemplo, o polinucleotídeo de referência, tal como, por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 tendo a sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18). As mudanças na sequência de aminoácido ou ácido nucleico da variante podem ser, por exemplo, substituições, inserções, supressões, truncamentos N-terminais ou truncamentos C-terminais de aminoácido ou ácido nucleico ou qualquer combinação destes. Em particular, as substituições de aminoácido podem ser substituições conservativas e/ou não conservativas. Uma variante pode ser caracterizada por identidade de sequência de aminoácido ou identidade de sequência de ácido nucleico ao polipeptídeo de referência ou polinucleotídeo precursor, respectivamente. Por exemplo, uma variante pode incluir qualquer polipeptídeo tendo pelo menos 50 % (por exemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais) de identidade de sequência ao polipeptídeo ou polinucleotídeo de referência.

[055] Por "vetor" significa uma construção de DNA que inclui um ou mais polinucleotídeos ou fragmentos destes, que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 ou variante deste, tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante deste, com ou sem um peptídeo de sinal). O vetor pode ser usado para infectar uma célula (por exemplo, uma célula hospedeira ou uma célula de um paciente tendo um transtorno de retardo do crescimento esquelético humano, tal como acondroplasia), que resulta na tradução dos polinucleotídeos do vetor em um polipeptídeo de sFGFR3. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA de filamento duplo circular em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma cé-

lula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores mamíferos episssômicos). Outros vetores (por exemplo, vetores mamíferos não episssômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e desse modo são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operativamente ligados. Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos.

[056] A frase "deposição de gordura visceral" se refere a depósitos de gordura intra-abdominais, incluindo depósitos mesentéricos e omentais, depósitos de gordura retroperitoneais e depósitos de gordura intratorácicos, incluindo pericárdicos.

[057] A recitação aqui de faixas numéricas por pontos de extremidade é intencionada a incluir todos os números incluídos dentro desta faixa (por exemplo, uma recitação de 1 a 5 inclui 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4 e 5).

[058] Outras características e vantagens da invenção estarão evidentes a partir da Descrição Detalhada seguinte e das Reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[059] O arquivo da patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cor. Cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho(s) colorido(s) serão fornecidas pelo Escritório após solicitação e pagamento da taxa necessária.

[060] As FIGURAS 1A a 1D são tabelas, uma imagem e gráficos que mostram que crianças com acondroplasia desenvolvem obesidade abdominal sem um aumento em níveis de glicose no sangue. A FIG. 1A é uma tabela que mostra as medições de peso, altura e IMC e es-

cores z de altura-para-idade e IMC-para-idade correspondentes na variação de três grupos de idade (n = 73 pontos de dados no grupo de [0 a 3] anos, n = 61 pontos de dados no grupo de [4 a 8] anos e n = 36 pontos de dados no grupo de [9 a 18] anos). Resultados das análises post hoc: a: significativamente diferente entre os grupos [0 a 3] e [4 a 8]; b: significativamente diferente entre os grupos [0 a 3] e [9 a 18]; c: significativamente diferente entre os grupos [4 a 8] e [9 a 18]. A FIG. 1B é uma representação por imagem das diferentes regiões de interesse (ROI) avaliadas por DXA. A FIG. 1C é um gráfico que mostra a medição da razão de gordura androide:ginoide na variação de três grupos de idade (n = 4 pontos de dados no grupo de [0 a 3] anos, n = 6 pontos de dados no grupo de [4 a 8] anos e n = 9 pontos de dados no grupo de [9 a 18] anos). A FIG. 1D é um gráfico que mostra a concentração plasmática de glicose de jejum na variação de dois grupos de idade [4 a 8] e [9 a 18] anos (n = 16 pontos de dados no grupo de [4 a 8] anos e n = 12 pontos de dados no grupo de [9 a 18] anos). Linhas horizontais representam valores normais. Os dados são representados como média ± SD, **p<0,01, ***p<0,001.

[061] As FIGURAS 2A a 2H são gráficos e imagens que mostram que camundongos *Fgfr3*$^{ach/+}$ transgênicos preferencialmente desenvolvem obesidade visceral que é prevenida durante o tratamento com sFGFR3 (SEQ ID NO: 1). A FIG. 2A é um gráfico que mostra o peso corpóreo de camundongos WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratados com veículo e camundongos *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratados com sFGFR3 depois de 10 semanas de inoculação com ND ou HFD. A FIG. 2B são imagens e um gráfico que mostra a razão de massa magra:gordura abdominal. A FIG. 2C é um gráfico que mostra o peso do tecido adiposo epididimal (eAT). A FIG. 2D é um gráfico que mostra o peso do tecido adiposo subcutâneo (scAT) por grama de peso corpóreo. A FIG. 2E é um gráfico que mostra a área de adipócito em scAT. A FIG. 2F é um gráfico que mostra a

área de adipócito em eAT. A FIG. 2G é um gráfico que mostra a dispersão *scat* de adipócitos de acordo com seu diâmetro. Os dados são apresentados como média +/- desvio padrão (n = 8 a 10 camundongos para cada grupo). Os dados seguiram a distribuição normal. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* WT tratado com veículo, $^{\#}p$<0,05, $^{\#\#}p$<0,01 *versus* *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratado com veículo; teste t de Student. A FIG. 2H é um gráfico que mostra a dispersão em eAT de adipócitos de acordo com seu diâmetro. Os dados são apresentados como média +/- desvio padrão (n = 8 a 10 camundongos para cada grupo). Os dados seguiram a distribuição normal. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* WT tratado com veículo, $^{\#}p$<0,05, $^{\#\#}p$<0,01 *versus* *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratado com veículo; teste t de Student.

[062] As FIGURAS 3A a 3B são gráficos que mostram que MSCs isoladas de camundongos *Fgfr3*$^{ach/+}$ não tratados ou tratados com sFGFR3 demonstram preocupação para adipogênese sem nenhuma alteração da resposta de insulina comparado a camundongos WT. A FIG. 3A é um gráfico que mostra a expressão de genes envolvidos em diferentes etapas de diferenciação de adipogênese (genes listados na Tabela 1). A expressão foi normalizada para expressão de HPRT, RPL6 e RPL13a e expressada como porcentagem de mudança comparado a WT. A FIG. 3B são gráficos que mostram os resultados de células estimuladas com 50 nM de insulina por 0, 5, 15 ou 30 min ou com 0, 1, 10, 50 ou 100 nM de insulina durante 5 min. A expressão de P-Erk1/2, normalizada para expressão total de Erk1/2, foi expressada como valor normalizado para WT. Os dados são representados como média ± SD. Os dados seguiram a distribuição normal. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* WT tratado com veículo, $^{\#}p$<0,05, $^{\#\#}p$<0,01 *versus* *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratado com veículo. ANOVA de duas vias com teste múltiplo de Tukey.

[063] As FIGURAS 4A a 4E são gráficos e imagens microscópi-

cas que mostram que o metabolismo da glicose é alterado em camundongos *Fgfr3ach/+* transgênicos e restaurado com tratamento com sFGFR3. A FIG. 4A é um gráfico que mostra glicemia de jejum e insulinemia de camundongos a seguir de 10 semanas de ND. A FIG. 4B é um gráfico que mostra glicemia de jejum e insulinemia de camundongos a seguir de 10 semanas de HFD. A FIG. 4C mostra gráficos dos resultados de um teste de tolerância à glicose em HFD; níveis de glicose foram normalizados ao valor de tempo -15 min e área sob a curva correspondente para cada grupo de camundongos. A FIG. 4D primeiro mostra a microscopia do teor de insulina no pâncreas de camundongos (imunoistoquímica de seções embutidas em parafina, vermelho: insulina; verde: glicose; azul: manchamento com DAPI). A FIG. 4D também mostra um gráfico do teor de insulina no pâncreas de camundongos, média de ilhotas pancreáticas normalizadas para superfície total e média de número de ilhotas em cada grupo sob uma condição de HFD. A FIG. 4E mostra a microscopia de manchamento com H&E e PAS no fígado sob condição de HFD. A FIG. 4F mostra a microscopia de manchamento com H&E de nódulos hepáticos. Os dados são representados como média ± SD (n = 8 a 10 camundongos para cada grupo). Os dados seguiram a distribuição normal. $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$ *versus* WT tratado com veículo, $^{\#}p<0,05$, $^{\#\#}p<0,01$ *versus* *Fgfr3ach/+* tratado com veículo; teste t de Student.

[064] As FIGURAS 5A a 5D são gráficos que mostram que camundongos $Fgfr3^{ach/+}$ transgênicos não tratados retiram essencialmente toda sua energia dos lipídeos. A FIG. 5A mostra o quociente respiratório basal (RQ = VCO2/VO2) durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos a seguir de 10 semanas de inoculação com ND. A FIG. 5B mostra a oxidação de carboidrato e lipídeo basal em camundongos inoculados com ND WT e $Fgfr3^{ach/+}$. A FIG. 5C mostra o quociente respiratório basal (RQ = VCO2/VO2) durante períodos de jejum e

alimentação noturnos ou diurnos a seguir de 10 semanas de inoculação com HFD. A FIG. 5D mostra a oxidação de carboidrato e lipídeo basal em camundongos inoculados com HFD WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. Os dados são representados como média ± SD (n = 8 a 10 camundongos para cada grupo). Os dados seguiram a distribuição normal. ***p*<0,01, ****p*<0,001 *versus* WT tratado com veículo, $^{\#}p$<0,05, $^{\#\#}p$<0,01 *versus* *Fgfr3*$^{ach/+}$ tratado com veículo; teste t de Student.

[065] As FIGURAS 6A a 6B são gráficos que mostram adipocinas circulantes estudadas no soro de camundongos *Fgfr3*$^{ach/+}$ não tratados ou tratados com sFGFR3. A FIG. 6A é um gráfico que mostra os resultados de camundongos inoculados com um ND. A FIG. 6B é um gráfico que mostra resultados de camundongos inoculados com um HFD. Os resultados foram expressados como porcentagem de mudança comparado a WT. AgRP, proteína relacionada a agouti; ANGPT-L3, angiopoietina-3; CRP, proteína C-reativa; DPPIV, dipeptidil peptidase V; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; HGF, fator de crescimento de hepatócito; ICAM-1, molécula-1 de adesão intercelular; IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; IGFBP, proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina; MCP-1, proteína-1 quimiotática monocítica; M-CSF, fator coestimulante de macrófago; Pref-1, fator 1 pré-adipócito; RAGE, receptor para produtos finais de glicação avançada; RANTES, receptor após ativação, célula T normal expressada e secretada; RBP4, proteína de ligação a retinol; TIMP-1, tecido inibidor de metaloproteinases; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

[066] As FIGURAS 7A a 7H são gráficos que mostram que camundongos transgênicos com acondroplasia exibiram gasto energético normal, atividade cumulativa e criação cumulativa durante a calorimetria indireta. A FIG. 7A mostra o consumo de oxigênio basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundon-

gos inoculados com ND WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7B mostra a produção de dióxido de carbono basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundongos inoculados com ND WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7C mostra o gasto de energia basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundongos inoculados com ND WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7D mostra a atividade e criação cumulativas basais em camundongos inoculados com ND WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7E mostra o consumo de oxigênio basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundongos inoculados com HFD WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7F mostra a produção de dióxido de carbono basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundongos inoculados com HFD WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7G mostra o gasto de energia basal durante períodos de jejum e alimentação noturnos ou diurnos em camundongos inoculados com HFD WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. A FIG. 7H mostra a atividade e criação cumulativas basais em camundongos inoculados com HFD WT e *Fgfr3*$^{ach/+}$. Os dados são representados como média ± SD (n = 8 a 10 camundongos para cada grupo). Os dados seguiram a distribuição normal. $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$ *versus* WT tratado com veículo, $^{\#\#\#}p<0,001$ *versus Fgfr3*$^{ach/+}$ tratado com veículo; teste t de Student.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[067] Descobrimos que polipeptídeos de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3) e polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR3 e variantes destes, podem ser usados para tratar deposição de gordura visceral anormal em um paciente (por exemplo, um ser humano, particularmente um feto, um neonato, uma criança, um adolescente e um adulto) em necessidade deste. Em particular, polipeptídeos de sFGFR3 que podem ser usados nos métodos de tratamento descritos aqui incluem aqueles tendo uma sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e

variantes destes tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência a estes. Polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR ou células contendo os polinucleotídeos também podem ser administrados nos métodos de tratamento.

Métodos de Tratamento

[068] Fornecidos aqui são métodos para tratar um paciente com deposição de gordura visceral anormal e as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal. Em particular, o paciente pode ter um índice de massa corpórea, diâmetro sagital, razão de gordura androide:ginoide, índice de massa gorda e área de gordura visceral elevados. O paciente também pode ter uma síndrome de retardo do crescimento esquelético, por exemplo, acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDAN), hipocondroplasia e craniossinostoses (por exemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon e síndrome Crouzonodermoesquelética, camptodactilia, estatura alta e síndrome de perda auditiva (CATSHL). Isto pode ser o caso que o paciente tem uma síndrome de retardo do crescimento esquelético e uma condição associada com a deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, aterosclerose, hipertensão, infarto do miocárdio, dislipidemia, apneia do sono, doença pulmonar restritiva, asma, demência, desregulação de insulina (por exemplo, resistência à insulina), desregulação de metabolismo da glicose, infertilidade, irregularidades menstruais, acidente vascular cerebral e demência.

[069] Alternativamente, o paciente pode ser um que não tem uma síndrome de retardo do crescimento esquelético, mas tem uma condição que leva à deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, obesidade, síndrome do ovário policístico e hipercortisolismo (por exemplo, doença de Cushing)). Por exemplo, o paciente pode ter de-

posição de gordura visceral anormal e uma condição associada com a deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, aterosclerose, hipertensão, infarto do miocárdio, dislipidemia, apneia do sono, doença pulmonar restritiva, asma, demência, desregulação de insulina (por exemplo, resistência à insulina), desregulação de metabolismo da glicose, infertilidade, irregularidades menstruais, acidente vascular cerebral e demência). O método também pode envolver a administração de um sFGFR3 para tratar um paciente com sinalização aberrante de FGF10, tal como um paciente com doença de Cushing causada por disfunção da glândula pituitária.

[070] O paciente também pode ser caracterizado como tendo deposição de gordura visceral associada com ou adjacente a um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestinos, órgãos reprodutivos e vesícula biliar.

[071] O método envolve administrar um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção, por exemplo, aqueles descritos aqui, ao paciente tendo deposição de gordura visceral anormal. O paciente pode ser um feto, um neonato, um infante, uma criança, um adolescente ou um adulto em risco de desenvolver deposição de gordura abdominal anormal. O paciente também pode ter uma síndrome de retardo do crescimento esquelético (por exemplo, acondroplasia), obesidade, hipercortisolismo (por exemplo, doença de Cushing) ou síndrome do ovário policístico. O paciente (por exemplo, um ser humano) pode ser tratado antes de sinais e sintomas de deposição de gordura visceral anormal se desenvolverem. Em particular, pacientes que podem ser tratados com um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção descrita aqui são aqueles que exibem sintomas incluindo, mas não limitados a, índice de massa gorda anormal, área de gordura visceral anormal, IMC elevado, circunferência da cintura aumentada, diâmetro sagital aumentado e razão de gordura androide:ginoide aumentada. Além disso, pacientes que po-

dem ser tratados com um polipeptídeo de sFGFR3 têm distribuição de gordura visceral anormal e condições associadas com deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, doenças metabólicas, cardiovasculares, pulmonares, reprodutivas ou neurológicas). Além disso, o tratamento com um polipeptídeo de sFGFR3 pode resultar em uma melhoria em um ou mais dos sintomas anteriormente mencionados relacionados à deposição de gordura visceral anormal (por exemplo, em relação a um paciente não tratado). O paciente (por exemplo, um ser humano) pode ser diagnosticado com deposição de gordura visceral anormal, tal como um com síndrome de retardo do crescimento esquelético (por exemplo, acondroplasia), obesidade, hipercortisolismo (por exemplo, doença de Cushing) e síndrome do ovário policístico, antes da administração de um polipeptídeo de sFGFR3. Adicionalmente, o paciente tendo deposição de gordura visceral anormal pode ser um que não foi previamente tratado com um polipeptídeo de sFGFR3.

[072] Um paciente que pode ser tratado com um polipeptídeo de sFGFR3 também inclui um paciente com ou em risco de desenvolver, diabete, tal como um paciente obeso. O tratamento deste paciente pode envolver administrar localmente o FGFR3 solúvel ao pâncreas de modo a tratar ou prevenir o desenvolvimento de diabete.

Polipeptídeos de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3)

[073] Polipeptídeos de FGFR3 solúvel e variantes destes podem ser usados nos métodos de tratar um paciente tendo deposição de gordura visceral anormal. O polipeptídeo de sFGFR3 pode incluir pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular (ECD) de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente (por exemplo, o polipeptídeo de FGFR3 tendo a sequência apresentada no Nº de Acesso no Genbank NP_000133; consultar também a SEQ ID NO: 8). Em particu-

lar, o polipeptídeo de sFGFR3 pode incluir 100 a 370 aminoácidos consecutivos (por exemplo, menos do que 350 aminoácidos consecutivos) de um ECD de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente. O polipeptídeo de sFGFR3 também pode ter um domínio 1, 2 e/ou 3 do tipo C2 semelhante a Ig de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

[074] O polipeptídeo de sFGFR3 pode ter ou pode carecer de, um peptídeo de sinal (por exemplo, um peptídeo de sinal de um polipeptídeo de FGFR3, tal como aquele correspondendo à SEQ ID NO: 21; em particular, o sFGFR3 é um polipeptídeo maduro que carece do peptídeo de sinal, que é clivado durante a expressão e secreção da célula). O polipeptídeo de sFGFR3 também carece de um domínio de transmembrana (TM), tal como a TM de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

[075] Os polipeptídeos de sFGFR3 também podem conter todo ou uma porção de um domínio intracelular (ICD) de um polipeptídeo de FGFR3. Por exemplo, o polipeptídeo de sFGFR3 pode ter 400 aminoácidos consecutivos ou menos (por exemplo, entre 5 e 399 aminoácidos consecutivos, tais como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15 ou menos aminoácidos consecutivos) de um ICD de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente. O ICD do polipeptídeo de sFGFR3 também pode carecer de um domínio de tirosina cinase de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente. Alternativamente, o polipeptídeo de sFGFR3 pode carecer de quaisquer aminoácidos de um ICD de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente (por exemplo, o polipeptídeo de FGFR3 da SEQ ID NO: 8).

[076] O polipeptídeo de sFGFR3 também pode ter uma sequência de aminoácido com pelo menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 % ou 99 % de identidade de sequência à ou a sequência de, aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

[077] Um polipeptídeo de sFGFR3 para o uso nos métodos descrito aqui pode ser menos do que 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150 ou 100 aminoácidos em comprimento e/ou pode ter uma sequência de aminoácido com pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência) aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8. O polipeptídeo de sFGFR também pode ser um com uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência) à sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7. Em particular, o sFGFR3 tem a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 ou 6 (por exemplo, a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5). O polipeptídeo de sFGFR3 também pode ter a sequência da SEQ ID NO: 6, exceto que o resíduo na posição 253 é uma alanina, glicina, prolina ou treonina.

[078] Variantes de polipeptídeo de sFGFR3 que podem ser administradas nos métodos também incluem fragmentos da sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 8 (por exemplo, pelo menos os 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, 1 a 280, 1 a 285, 1 a 290 ou 1 a 300, da SEQ ID NO: 8) ou polipeptídeos tendo pelo menos 50 % de identidade de sequência (por exemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais identidade de sequência) a qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 8 (e que, por exemplo, carecem de um peptídeo de sinal e domínio de TM).

[079] Os polipeptídeos de sFGFR3 da invenção também podem ser caracterizados como ligação a um fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Em particular, o FGF é selecionado do grupo consistindo em fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF1; SEQ ID NO: 26), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2; SEQ ID NO: 27), fator de crescimento de fibroblasto 9 (FGF9; SEQ ID NO: 28), fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10; SEQ ID NO: 40), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18; SEQ ID NO: 29), fator de crescimento de fibroblasto 19 (FGF19; SEQ ID NO: 30), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21; SEQ ID NO: 31) e fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23; SEQ ID NO: 41). A ligação é caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de 0,2 nM a cerca de 20 nM (por exemplo, uma K_d de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM, em que opcionalmente a K_d é cerca de 1 nm, cerca de 2 nm, cerca de 3 nm, cerca de 4 nm, cerca de 5 nm, cerca de 6 nm, cerca de 7 nm, cerca de 8 nm, cerca de 9 nm ou cerca de 10 nm).

[080] Dados os resultados descritos aqui, a invenção não é limitada a um polipeptídeo de sFGFR3 particular ou variante deste. Além dos polipeptídeos de sFGFR3 exemplares e variantes destes debatidos acima, qualquer polipeptídeo de sFGFR3 que se liga a um ou mais FGFs com uma afinidade de ligação similar como os polipeptídeos de sFGFR3 tendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1 a 7 também é visionado como sendo útil para tratar deposição de gordura visceral anormal em um sujeito em necessidade deste. Os polipeptídeos de sFGFR3 podem ser, por exemplo, fragmentos de isoforma 2 de FGFR3 que carece dos exons 8 e 9 que codificam a metade C-terminal do domínio de IgG3 e exon 10 incluindo o domínio de transmembrana (por exemplo, fragmentos da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8), correspondendo aos fragmentos de variante 2 de transcrito de FGFR3 (Nº de Acesso NM_022965).

[081] Como observado acima, um polipeptídeo de sFGFR3 para o uso nos métodos da invenção pode incluir um peptídeo de sinal na posição N-terminal. Um peptídeo de sinal exemplar pode incluir, mas não é limitado a, aminoácidos 1 a 22 da SEQ ID NO: 21 (por exemplo, MGAPACALALCVAVAIVAGASS). Consequentemente, os polipeptídeos de sFGFR3 incluem ambas as formas secretadas, que carecem do peptídeo de sinal N-terminal e formas não secretadas, que incluem o peptídeo de sinal N-terminal. Por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 secretado pode incluir a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7, mas sem um peptídeo de sinal N-terminal (por exemplo, a sequência da SEQ ID NO: 21). Alternativamente, o polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7) inclui um peptídeo de sinal, tal como a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21. Uma pessoa habilitada na técnica avaliará que a posição do peptídeo de sinal N-terminal variará em diferentes polipeptídeos de sFGFR3 e pode incluir, por exemplo, os primeiros 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 30 ou mais resíduos de aminoácido no término N do polipeptídeo. Uma pessoa de habilidade na técnica pode prever a posição de um sítio de clivagem de sequência de sinal, por exemplo, por um algoritmo de computador apropriado tal como aquele descrito em Bendtsen *et al*. (*J. Mol. Biol.* 340(4):783 - 795, 2004) e disponível na Rede em cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

[082] Adicionalmente, polipeptídeos de sFGFR3 da invenção podem ser glicosilados. Em particular, um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser alterado para aumentar ou diminuir o grau ao qual o polipeptídeo de sFGFR3 é glicosilado. A adição ou supressão de sítios de glicosilação a um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser realizada alterando-se a sequência de aminoácido tal que um ou mais sítios de glicosilação são

criados ou removidos. Por exemplo, glicosilação N-ligada, em que um oligossacarídeo é ligado ao nitrogênio da amida de um resíduo de asparagina, pode ocorrer na posição Asn76, Asn148, Asn169, Asn 203, Asn240, Asn272 e/ou Asn 294 da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 ou 6 e variantes deste. Um ou mais destes resíduos de Asn também podem ser substituídos para remover o sítio de glicosilação. Por exemplo, a glicosilação O-ligada, em que um oligossacarídeo é ligado a um átomo de oxigênio de um resíduo de aminoácido, pode ocorrer na posição Ser109, Thr126, Ser199, Ser274, Thr281, Ser298, Ser299 e/ou Thr301 da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 ou 6 e variantes deste. Adicionalmente, a glicosilação O-ligada pode ocorrer em um resíduo de serina dentro do sFGFR3. Um ou mais destes resíduos de Ser ou Thr também podem ser substituídos para remover o sítio de glicosilação.

Polipeptídeos de fusão de sFGFR3

[083] Os polipeptídeos de sFGFR3 da invenção (por exemplo, polipeptídeos de sFGFR3 tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante destes tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência a estes (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a estes) podem ser fundidos a um domínio funcional de um polipeptídeo heterólogo (por exemplo, uma região do fragmento cristalizável (região Fc; tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 35 e 36) ou albumina sérica humana (HSA; tal como um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 37)) para fornecer um polipeptídeo de fusão de sFGFR3. Opcionalmente, um ligante flexível, pode ser incluído entre o polipeptídeo de sFGFR3 e o polipeptídeo heterólogo (por exemplo, uma região Fc ou HSA), tal como uma sequência rica em

serina ou glicina (por exemplo, uma poliglicina ou um ligante de poliglicina/serina, tais como as SEQ ID NOs: 38 e 39).

[084] Por exemplo, os polipeptídeos de sFGFR3 e variantes destes podem ser um polipeptídeo de fusão incluindo, por exemplo, uma região Fc de uma imunoglobulina no domínio N-terminal ou C-terminal. Em particular, regiões Fc úteis podem incluir o fragmento Fc de qualquer molécula de imunoglobulina, incluindo IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE e suas subclasses variadas (por exemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1, IgA-2) de qualquer mamífero (por exemplo, um ser humano). Por exemplo, a IgG-1 humana de fragmento Fc (SEQ ID NO: 35) ou uma variante de IgG-1 humana, tal como uma variante incluindo uma substituição de asparagina na posição 297 da SEQ ID NO: 35 com alanina (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 36). Os fragmentos Fc da invenção podem incluir, por exemplo, os domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada e qualquer porção da região da dobradiça. Os polipeptídeos de fusão de sFGFR3 da invenção também podem incluir, por exemplo, um Fc monomérico, tal como um domínio CH2 ou CH3. A região Fc pode ser opcionalmente glicosilada em quaisquer um ou mais resíduos de aminoácido apropriados conhecidos àqueles habilitados na técnica. Um fragmento Fc como descrito aqui pode ter 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 ou mais adições, supressões ou substituições em relação a qualquer um dos fragmentos Fc descritos aqui.

[085] Adicionalmente, os polipeptídeos de sFGFR3 podem ser conjugados a outras moléculas no domínio N-terminal ou C-terminal para o propósito de melhorar a solubilidade e estabilidade da proteína em solução aquosa. Exemplos de tais moléculas incluem albumina sérica humana (HSA), PEG, PSA e albumina sérica bovina (BSA). Por exemplo, os polipeptídeos de sFGFR3 podem ser conjugados a HSA

humana (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 37) ou um fragmento desta.

[086] Os polipeptídeos de fusão de sFGFR3 podem incluir uma região ligadora de peptídeo entre o polipeptídeo de sFGFR3 e o polipeptídeo heterólogo (por exemplo, uma região Fc ou HSA). A região ligadora pode ser de qualquer sequência e comprimento que permite que o sFGFR3 permaneça biologicamente ativo, por exemplo, não estericamente impedido. Comprimentos de ligante exemplar estão entre 1 e 200 resíduos de aminoácido, por exemplo, 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 25, 26 a 30, 31 a 35, 36 a 40, 41 a 45, 46 a 50, 51 a 55, 56 a 60, 61 a 65, 66 a 70, 71 a 75, 76 a 80, 81 a 85, 86 a 90, 91 a 95, 96 a 100, 101 a 110, 111 a 120, 121 a 130, 131 a 140, 141 a 150, 151 a 160, 161 a 170, 171 a 180, 181 a 190 ou 191 a 200 resíduos de aminoácido. Por exemplo, ligantes incluem ou consistem em porções flexíveis, por exemplo, regiões sem estrutura secundária ou terciária fixa significativa. Faixas preferidas são 5 a 25 e 10 a 20 aminoácidos em comprimento. Tal flexibilidade é geralmente aumentada se os aminoácidos forem pequenos e não tiverem cadeias laterais volumosas que impedem a rotação ou curvatura da cadeia de aminoácido. Assim, preferivelmente o ligante de peptídeo da presente invenção tem um teor aumentado de aminoácidos pequenos, em particular de glicinas, alaninas, serinas, treoninas, leucinas e isoleucinas.

[087] Ligantes flexíveis exemplares são ligantes ricos em glicina, por exemplo, contendo pelo menos 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou ainda 100 % de resíduos de glicina. Ligantes também podem conter, por exemplo, ligantes ricos em serina, por exemplo, contendo pelo menos 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou ainda 100 % de resíduos de serina. Em alguns casos, a sequência de aminoácido de um ligante consiste apenas em resíduos de glicina e serina. Por exemplo, o ligante pode ser a sequência de ami-

noácido de GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 38) ou GGGGSGGGGSGG GGS (SEQ ID NO: 39). Um ligante pode ser opcionalmente glicosilado em qualquer um ou mais resíduos de aminoácido apropriados. O ligante também pode estar ausente, em que o polipeptídeo de sFGFR3 e o polipeptídeo heterólogo (por exemplo, uma região Fc ou HSA) são fundidos juntos diretamente, sem nenhum resíduo de intervenção.

Polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR3

[088] Polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR3 podem ser usados para tratar um paciente tendo deposição de gordura visceral anormal em um paciente (por exemplo, um ser humano, tal como um feto, um neonato, um infante, uma criança, um adolescente ou um adulto). Por exemplo, o polinucleotídeo pode ter a sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18 ou uma variante deste tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais identidade de sequência) à sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18. Adicionalmente, o polinucleotídeo pode ter a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 14 ou 15 ou uma variante tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência (por exemplo, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou mais identidade de sequência) à sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 14 ou 15.

[089] Também caracterizados são polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de fusão de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 fundido a um polipeptídeo heterólogo, tal como uma região Fc ou HSA) e polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR3 sem um peptídeo de sinal (por exemplo, polipeptídeos tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7) ou com um peptídeo de sinal (por exemplo, polipeptídeos tendo a se-

quência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7. Adicionalmente, os polinucleotídeos podem ter uma ou mais mutações para alterar qualquer um dos sítios de glicosilação descritos aqui ou conhecidos como estando presentes no polipeptídeo.

[090] Opcionalmente, os polinucleotídeos da invenção podem ser otimizados de códon para alterar os códons no ácido nucleico, em particular para refletir o uso de códon típico do organismo hospedeiro (por exemplo, um ser humano) sem alterar o polipeptídeo de sFGFR3 codificado pela sequência de ácido nucleico do polinucleotídeo. Polinucleotídeos otimizados de códon (por exemplo, um polinucleotídeo tendo a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 14 ou 16) podem, por exemplo, facilitar as manipulações genéticas diminuindo-se o teor de GC e/ou para expressão em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula HEK 293 ou uma célula CHO). A otimização de códon pode ser realizada pela pessoa habilitada, por exemplo, usando-se ferramentas em linha tais como JAVA Codon Adaption Tool (www.jcat.de) ou Integrated DNA Technologies Tool (www.eu.idtdna.com/CodonOpt) simplesmente entrando-se na sequência de ácido nucleico do polinucleotídeo e do organismo hospedeiro para o qual os códons devem ser otimizados. O uso de códon de organismos diferentes está disponível na base de dados em linha, por exemplo, www.kazusa.ou.jp/codon.

Células hospedeiras para a expressão dos polipeptídeos de sFGFR3

[091] Células mamíferas podem ser usadas como células hospedeiras para a expressão do polipeptídeo de sFGFR3 (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste). Tipos de célula mamífera exemplares úteis nos métodos incluem, mas não são limitados a, células de Rim Embrionário Humano (HEK; por exemplo, HEK 293), células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), células L, células C127, células 3T3, células BHK, células COS-7, células HeLa, células PC3, célu-

las Vero, células MC3T3, células NS0, células Sp2/0, células VERY, BHK, células MDCK, células W138, células BT483, células Hs578T, células HTB2, células BT20, células T47D, células NS0, células CRL7O3O e células HsS78Bst ou qualquer outra célula hospedeira mamífera adequada conhecida na técnica. Alternativamente, células de *E. coli* podem ser usadas como células hospedeiras para a expressão dos polipeptídeos de sFGFR3. Exemplos de cepas de *E. coli* incluem, mas não são limitados a, *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) ou qualquer outra cepa de *E. coli* adequada conhecida na técnica.

Vetores incluindo polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos de sFGFR3

[092] Também caracterizados são vetores recombinantes incluindo qualquer um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima (por exemplo, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste). Os vetores da invenção podem ser usados para liberar um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção e variantes deste, que pode incluir vetores de expressão mamíferos, virais e bacterianos. Por exemplo, os vetores podem ser plasmídeos, cromossomos artificiais (por exemplo, SACO, PAC e YAC) e vetores virais ou de fago e podem incluir opcionalmente um promotor, realçador ou regulador para a expressão do polinucleotídeo. Os vetores também podem conter um ou mais genes marcadores selecionáveis, tal como um gene de resistência à ampicilina, neomicina e/ou canamicina no caso de um plasmídeo bacteriano ou um gene de resistência para um vetor fúngico. Vetores podem ser usados *in vitro* para a produção de DNA ou RNA ou usados para transfectar ou transformar uma célula hospedeira, tal como uma célula hospedeira mamífera para

a produção de um polipeptídeo de sFGFR3 codificado pelo vetor. Os vetores também podem ser adaptados para serem usados *in vivo* em um método de terapia genética.

[093] Vetores virais exemplares que podem ser usados para liberar um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) incluem um retrovírus, adenovírus (por exemplo, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50 e Pan9 (também conhecido como AdC68)), parvovírus (por exemplo, vírus adeno-associados), coronavírus, vírus de RNA de filamento negativo tais como ortomixovírus (por exemplo, vírus influenza), rabdovírus (por exemplo, vírus da raiva e estomatite vesicular), paramixovírus (por exemplo, sarampo e Sendai), vírus de RNA de filamento positivo, tais como picornavírus e alfavírus e Vírus de RNA de filamento duplo incluindo adenovírus, vírus do herpes (por exemplo, vírus do herpes simples tipos 1 e 2, vírus Epstein-Barr, citomegalovírus) e poxvírus (por exemplo, vaccinia, vaccinia Ankara modificado (MVA), bouba aviária e varíola dos canários). Outros vírus úteis para liberar polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de sFGFR3 incluem vírus Norwalk, togavírus, flavivírus, reovírus, papovavírus, hepadnavírus e vírus da hepatite. Exemplos de retrovírus incluem os vírus de leucose-sarcoma aviário, tipo C, tipo B mamíferos, vírus tipo D, grupo de HTLV-BLV, lentivírus e espumavírus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, *In Fundamental Virology*, Terceira Edição, B. N. Fields, *et al.*, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Métodos de Produção

[094] Polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste)

podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, um polinucleotídeo é gerado usando métodos de clonagem molecular e é colocado dentro de um vetor, tal como um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral ou um vetor de fago. O vetor é usado para transformar o polinucleotídeo em uma célula hospedeira apropriada para a expressão do polipeptídeo de sFGFR3.

Construção de vetor de ácido nucleico e células hospedeiras

[095] Os polipeptídeos de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) podem ser produzidos a partir de uma célula hospedeira. Os polinucleotídeos (por exemplo, polinucleotídeos tendo a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 14 ou 16 e variantes destes) que codificam polipeptídeos de sFGFR3 podem ser incluídos em vetores que podem ser introduzidos na célula hospedeira por técnicas convencionais conhecidas na técnica (por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta ou infecção). A escolha do vetor depende, em parte, das células hospedeiras a serem usadas. Geralmente, células hospedeiras são de origem procariótica (por exemplo, bacteriana) ou eucariótica (por exemplo, mamífera).

[096] Um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) pode ser preparado por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não são limitados a, mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio-dirigida) e mutagênese de PCR. Um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser obtido usando técnicas padrão, por exemplo, síntese genética. Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de sFGFR3 do tipo selvagem (por exemplo, um polipeptídeo

tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 8) pode ser mutado para conter substituições de aminoácido específicas usando técnicas padrão na técnica, por exemplo, mutagênese QuikChange™. Polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo de sFGFR3 podem ser sintetizados usando, por exemplo, um sintetizador de nucleotídeo ou técnicas de PCR.

[097] Polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) podem ser inseridos em um vetor capaz de replicar e expressar o polinucleotídeo em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. Vetores exemplares úteis nos métodos podem incluir, mas não são limitados a, um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral e um vetor de fago. Por exemplo, um vetor viral pode incluir os vetores virais descritos acima, tal como um vetor retroviral, vetor adenoviral ou vetor poxviral (por exemplo, vetor viral de vaccinia, tal como Vaccinia Ankara modificado (MVA)), vetor viral adeno-associado e vetor alfaviral)) contendo a sequência de ácido nucleico de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3. Cada vetor pode conter vários componentes que podem ser ajustados e otimizados para compatibilidade com a célula hospedeira particular. Por exemplo, os componentes do vetor podem incluir, mas não são limitados a, uma origem de replicação, um gene marcador de seleção, um promotor, um sítio de ligação a ribossomo, uma sequência de sinal, a sequência de ácido nucleico do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 e/ou uma sequência de terminação de transcrição.

[098] Os vetores descritos acima podem ser introduzidos em células hospedeiras apropriadas (por exemplo, células HEK 293 ou células CHO ou em uma célula hospedeira de um sujeito) usando técnicas convencionais na técnica, por exemplo, transformação, transfecção,

eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio e microinjeção direta. Uma vez que os vetores são introduzidos em células hospedeiras para a produção de um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção, as células hospedeiras são cultivadas em meio nutriente convencional modificado conforme apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo de sFGFR3. Métodos para a expressão de proteínas terapêuticas, tais como polipeptídeos de sFGFR3, são conhecidos na técnica, consultar, para exemplo, Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press; 2ª ed. 2004 (20 de julho de 2004) e Vladimir Voynov e Justin A. Caravella (eds.) *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)* Humana Press; 2ª ed. 2012 (28 de junho de 2012), cada um dos quais é, por meio deste, incorporado a título de referência em sua totalidade.

Produção, recuperação e purificação de polipeptídeo de sFGFR3

[099] Células hospedeiras (por exemplo, células HEK 293 ou células CHO) usadas para produzir o polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) podem ser cultivadas em meio conhecido na técnica e adequado para o cultivo das células hospedeiras selecionadas. Exemplos de meio adequado para células mamíferas hospedeiras incluem Meio Essencial Mínimo (MEM), Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Meio de Expressão Expi293™, DMEM suplementado com soro bovino fetal (FBS) e RPMI-1640. Exemplos de meio adequado para células hospedeiras bacterianas incluem caldo Luria (LB) mais suplementos necessários, tal como um agente de seleção, por exemplo, ampicilina. Células hospedeiras são cultivadas em temperaturas adequadas, tais como de cerca de 20 °C a cerca de 39 °C, por exemplo, de 25 °C a cerca de 37

°C, preferivelmente 37 °C e níveis de CO_2, tais como 5 a 10 % (preferivelmente 8 %). O pH do meio é geralmente de cerca de 6,8 a 7,4, por exemplo, 7,0, dependendo principalmente do organismo hospedeiro. Se um promotor induzível for usado no vetor de expressão, a expressão do polipeptídeo de sFGFR3 é induzida sob condições adequadas para a ativação do promotor.

[0100] Um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) pode ser recuperado do sobrenadante da célula hospedeira. Alternativamente, o polipeptídeo de sFGFR3 pode ser recuperado rompendo-se a célula hospedeira (por exemplo, usando choque osmótico, sonicação ou lise), seguido por centrifugação ou filtração para remover o polipeptídeo de sFGFR3. Após a recuperação do polipeptídeo de sFGFR3, o polipeptídeo de sFGFR3 depois pode ser mais purificado. Um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica de purificação de proteína, tal como afinidade de proteína A, outra cromatografia (por exemplo, cromatografia em coluna de troca iônica, afinidade e exclusão por tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas (consultar *Process Scale Purification of Antibodies*, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009, por meio deste incorporado a título de referência em sua totalidade).

[0101] Opcionalmente, o polipeptídeo de sFGFR3 da invenção (por exemplo, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 e variantes deste) pode ser conjugado a um rótulo detectável para purificação. Exemplos de rótulos adequados para o uso na purificação dos polipeptídeos de sFGFR3 incluem, mas não são limitados a, uma etiqueta de proteína, um fluoróforo, um cromóforo, um radiorrótulo, um coloide metálico, uma enzima

ou uma molécula quimioluminescente ou bioluminescente. Em particular, etiquetas de proteína que são úteis para a purificação dos polipeptídeos de sFGFR3 podem incluir, mas não são limitadas a, etiquetas de cromatografia (por exemplo, etiquetas de peptídeo consistindo em aminoácidos polianiônicos, tal como uma etiqueta FLAG ou uma etiqueta de hemaglutinina "HA"), etiquetas de afinidade (por exemplo, uma etiqueta de poli(His), proteína de ligação à quitina (CBP), proteína de ligação à maltose (MBP) ou glutationa-S-transferase (GST)), etiquetas de solubilização (por exemplo, tioredoxina (TRX) e poli(NANP)), etiquetas de epítopo (por exemplo, etiqueta V5, etiqueta Myc e etiqueta HA) ou etiquetas de fluorescência (por exemplo, GFP, variantes de GFP, RFP e variantes de RFP).

Métodos de Diagnose

[0102] Um paciente com deposição de gordura visceral anormal pode ser identificado como estando em necessidade de tratamento por uma de muitas técnicas conhecidas na técnica. Existem duas categorias de técnicas: técnicas antropométricas e imagiologia. Técnicas antropométricas contam com medições com base em medição por fita e escala. Técnicas de imagiologia contam com atenuação de feixes de raio X conforme eles percorrem através de um paciente ou com as propriedades magnéticas de núcleos de hidrogênio de um paciente.

[0103] Uma técnica antropométrica comumente usada que categoriza pacientes como com peso normal, sobrepeso ou obesos, é o índice de massa corpórea (IMC). IMC é calculado dividindo-se o peso de um paciente (em kg) pelo quadrado da altura do paciente (em m). O corte indicando que a obesidade em adultos é diferente dos limiares em crianças. Para adultos, a obesidade é considerada presente quando o IMC é 30 kg/m^2 ou maior (consultar, para exemplo, Nuttall, *Nutr. Today* 50(3):117 - 28, 2015); para crianças, o limiar para obesidade varia com base na idade e altura (consultar, para exemplo, van der

Sluis *et al*., *Arch. Dis. Child*. 87(4):341 - 347, 2002). As tabelas padrão para IMC em crianças têm limitações quando crianças acondroplásicas são consideradas (consultar, para exemplo, Hoover-Fong *et al*., *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 364 - 371, 2008).

[0104] Dentre as técnicas antropométricas, IMC não distingue entre deposição de gordura subcutânea e visceral. Como um resultado, gordura visceral abdominal anormal é melhor identificada usando a circunferência da cintura (medida exatamente acima do topo palpado do osso da crista ilíaca), diâmetro sagital (a distância anteroposterior da parte inferior das costas ao abdômen anterior) e a razão de gordura androide:ginoide (a circunferência da cintura dividida pela circunferência do quadril).

[0105] O corte para circunferência da cintura anormal é, para mulheres adultas, maior do que 83 cm e para homens adultos maior do que 90 cm (consultar, para exemplo, Zhu *et al*., *Am. J. Clin. Nutr.* 76(4):743 - 749, 2002). Para diâmetros sagitais, o corte para mulheres é maior do que 20,1 cm e para homens, maior do que 23,1 cm; consultar, para exemplo, Pimentel *et al*, *Nutr. Hosp.* 25(4):656 - 61, 2010. Finalmente, para a razão de gordura androide:ginoide, o corte para mulheres é maior do que 0,85, enquanto para homens é maior do que 0,9; consultar, para exemplo, Price *et al*, *Am. J. Clin. Nutr.* 84(2):449 - 460, 2006).

[0106] Uma técnica de imagiologia que conta com raios X é absorciometria de raio X de dupla energia (DXA), um método em que dois feixes de raio X de energia diferente são usados para determinar a massa gorda (em oposição à massa magra) e a partir desta determinação, uma medida chamada índice de massa gorda (massa gorda medida dividida pelo quadrado da altura) é derivada. O corte para deposição de gordura anormal em mulheres é maior do que 13 e o corte for deposição de gordura anormal em homens é maior do que 9; con-

sultar, para exemplo, Kelly *et al*, PLOS One, 4(9): 2009).

[0107] Tanto CT (usando raio X) quanto MRI (dependendo das propriedades magnéticas do corpo) podem formar imagem do abdômen em seção transversal e desse modo distinguir a deposição de gordura visceral da subcutânea. Com CT ou MRI, o corte para deposição de gordura visceral anormal em mulheres é 110 cm^2 e para homens é 132 cm^2; consultar, para exemplo, Wajchenberg, *Endocr. Rev.* 21(6):697 - 738, 2000.

Métodos de Terapia de Monitoramento

[0108] Para avaliar um efeito da terapia, um paciente tratado com um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser seguido usando uma variedade de biomarcadores do estado da doença. Para um paciente tratado para reduzir ou impedir a deposição de gordura visceral anormal, técnicas de monitoramento incluem, por exemplo, determinar a melhoria em IMC, diâmetro sagital, razão de androide:ginoide, circunferência da cintura, índice de massa gorda e área de gordura visceral em uma imagem em seção transversal padronizada do abdômen. O efeito da terapia também pode ser avaliado usando um ou mais biomarcadores encontrados em, por exemplo, uma amostra do paciente (por exemplo, uma amostra de sangue, urina ou saliva). No caso de um paciente tratado para prevenir ou melhorar doenças metabólicas, tais como diabete ou esteatose hepática, testes sanguíneos para monitorar um efeito da terapia incluem, por exemplo, avaliar a amostra do paciente quanto a uma mudança nos níveis de glicose e/ou insulina, uma melhoria no teste de tolerância à glicose e uma diminuição em níveis elevados de alanina transaminase, aspartato aminotransferase e/ou fosfatase alcalina.

[0109] Se um paciente está recebendo terapia com polipeptídeo de sFGFR3 para tratar ou reduzir o risco de doenças cardiovasculares, um teste sanguíneo pode ser realizado para mostrar melhoria em um

nível de triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade, lipoproteínas de baixa densidade e/ou colesterol. Alternativamente, teste de estresse de radioisótopo pode ser feito para mostrar uma melhoria na tolerância a exercício e/ou perfusão cardíaca de um paciente.

[0110] Para pacientes tratados para melhorar ou reduzir o risco de demência, teste neuropsicológico serial pode ser realizado.

[0111] Em casos em que o polipeptídeo de sFGFR3 é administrado para tratar ou reduzir o risco de infertilidade ou irregularidades menstruais, um nível de um biomarcador sanguíneo, tal como hormônio folículo-estimulante, hormônio luteinizante, estradiol e prolactina, pode ser medido.

[0112] Se um paciente está sofrendo ou em risco de apneia do sono, um estudo que mede, por exemplo, o oxigênio, taxa respiratória, frequência cardíaca, ronco e/ou movimento corporal do paciente adormecido pode ser realizado a seguir da terapia com um polipeptídeo de sFGFR3 para avaliar o efeito da terapia.

[0113] Em um paciente para o qual um polipeptídeo de sFGFR3 é fornecido para tratar ou prevenir doença pulmonar restritiva ou asma, o teste da função pulmonar usando, por exemplo, espirometria ou pletismografia, pode ser usado para mostrar uma melhoria em medidas pulmonares, tais como volume corrente, capacidade vital, volume residual e/ou capacidade vital forçada.

[0114] Em um caso onde técnicas de monitoramento indicam que um paciente pode não estar respondendo ao tratamento usando um polipeptídeo de sFGFR3 ou para o qual um maior efeito de tratamento pode ser desejado, a administração de um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser repetida uma ou mais vezes ou a frequência de administração pode ser aumentada.

Administração de polipeptídeos de sFGFR3

[0115] Um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado para

tratar um paciente tendo ou em risco de deposição de gordura visceral anormal. Exemplos de polipeptídeos de sFGFR3 incluem, por exemplo, polipeptídeos de sFGFR3 tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante destes tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência a estes (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a estes). O polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado por qualquer via conhecida na técnica, tal como por administração parenteral, administração enteral ou administração tópica. Em particular, o polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado ao paciente tendo deposição de gordura visceral aumentada) subcutaneamente (por exemplo, por injeção subcutânea), intravenosamente, intramuscularmente, intra-arterialmente, intratecalmente ou intraperitonealmente.

[0116] Um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado a um paciente (por exemplo, um ser humano) em uma dosagem predeterminada, tal como em uma quantidade eficaz para tratar deposição de gordura visceral aumentada sem induzir toxicidade significativa. Por exemplo, polipeptídeos de sFGFR3 podem ser administrados a um paciente tendo deposição de gordura visceral aumentada em doses individuais variando de cerca de 0,002 mg/kg a cerca de 20 mg/kg (por exemplo, de 0,002 mg/kg a 20 mg/kg, de 0,01 mg/kg a 2 mg/kg, de ,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 ou 0,2 mg/kg a 3 mg/kg). Em particular, o polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado em doses individuais de, por exemplo, 0,001 mg/kg a 7 mg/kg, tal como 0,3 mg/kg a cerca de 2,5 mg/kg.

[0117] Doses exemplares de um polipeptídeo de sFGFR3 da in-

venção) para administração a um paciente (por exemplo, um ser humano) tendo deposição de gordura visceral aumentada) incluem, por exemplo, 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 ou 20 mg/kg. Estas doses podem ser administradas uma ou mais vezes (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 ou mais vezes) por dia, semana, mês ou ano. Por exemplo, um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado a pacientes em uma dosagem semanal variando, por exemplo, de cerca de 0,0014 mg/kg/semana a cerca de 140 mg/kg/semana, por exemplo, cerca de 0,14 mg/kg/semana a cerca de 105 mg/kg/semana, ou, por exemplo, cerca de 1,4 mg/kg/semana a cerca de 70 mg/kg/semana (por exemplo, 5 mg/kg/semana).

Terapia genética

[0118] Um polipeptídeo de sFGFR3 pode ser administrado a um paciente como uma molécula de ácido nucleico. Exemplos de moléculas de ácido nucleico que podem ser administradas incluem aquelas que codificam polipeptídeos de sFGFR3 tendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante destes tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência a estes (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a estes). Por exemplo, as moléculas de ácido nucleico podem ter a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18 ou uma variante destas com pelo menos 85 % de identidade de sequência a estas (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a estas).

[0119] As moléculas de ácido nucleico que codificam o polipeptídeo de sFGFR3 podem ser liberadas por terapia genética, em que um

polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 é liberado aos tecidos de interesse e expressado *in vivo*. Métodos de terapia genética são debatidos, por exemplo, em Verme *et al*. (*Nature* 389:239 - 242, 1997), Yamamoto *et al*. (*Molecular Therapy* 17:S67-S68, 2009) e Yamamoto *et al*., (*J. Bone Miner. Res.* 26: 135 - 142, 2011), cada um dos quais é por meio deste incorporado a título de referência.

[0120] Um polipeptídeo de sFGFR3 da invenção pode ser produzido pelas células de um paciente (por exemplo, um ser humano) tendo deposição de gordura visceral aumentada administrando-se um vetor (por exemplo, um plasmídeo, um cromossomo artificial (por exemplo, SACO, PAC e YAC) ou um vetor viral) contendo a sequência de ácido nucleico de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3. Por exemplo, um vetor viral pode ser um vetor retroviral, vetor adenoviral ou vetor poxviral (por exemplo, vetor viral de vaccinia, tal como Vaccinia Ankara modificado (MVA)), vetor viral adeno-associado ou vetor alfaviral. O vetor, uma vez dentro de uma célula do paciente (por exemplo, um ser humano) tendo um transtorno de retardo do crescimento esquelético (por exemplo, acondroplasia), por, por exemplo, transformação, transfecção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio ou microinjeção direta, promoverá a expressão do polipeptídeo de sFGFR3, que é depois secretado da célula. A invenção inclui ainda terapias com base em célula, em que o paciente (por exemplo, um ser humano) é administrado com uma célula que expressa o polipeptídeo de sFGFR3.

Composições farmacêuticas

[0121] Composições farmacêuticas que podem ser administradas para tratar um sujeito tendo deposição de gordura visceral anormal, como debatido aqui, contêm um polipeptídeo de sFGFR3, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira que contém o polinucleotídeo de sFGFR3. O polipeptídeo de

sFGFR3 pode ter a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 ou uma variante deste tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência a estes (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a este). As moléculas de ácido nucleico podem ter a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18 ou uma variante destas com pelo menos 85 % de identidade de sequência a estas (por exemplo, 86 % a 100 % de identidade de sequência, tal como 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência a estas). Composições incluindo um polipeptídeo de sFGFR3, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira que contém o polinucleotídeo de sFGFR3 podem ser formuladas em uma faixa de dosagens, em uma variedade de formulações e em combinação com excipientes, portadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis.

[0122] Uma composição farmacêutica incluindo um polipeptídeo de sFGFR3, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira que contém the polinucleotídeo de sFGFR3 pode ser formulada em uma dosagem específica, tal como uma dosagem que é eficaz para tratar um paciente (por exemplo, um ser humano) com deposição de gordura visceral aumentada sem induzir toxicidade significativa. Por exemplo, as composições podem ser formuladas para incluir entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 500 mg/mL do polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 (por exemplo, entre 10 mg/mL e 300 mg/mL, 20 mg/mL e 120 mg/mL, 40 mg/mL e 200 mg/mL, 30 mg/mL e 150 mg/mL, 40 mg/mL e 100 mg/mL, 50 mg/mL e 80 mg/mL ou 60 mg/mL e 70 mg/mL do polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3).

[0123] As composições farmacêuticas incluindo um polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 podem ser preparadas em uma varie-

dade de formas, tal como uma solução, dispersão ou suspensão líquida, pó ou outra estrutura regular adequada para armazenamento estável. Por exemplo, composições incluindo um polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 intencionadas para liberação sistêmica ou local podem estar na forma de soluções injetáveis ou infusíveis, tal como para administração parenteral (por exemplo, administração subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal ou intraperitoneal). Composições de sFGFR3 para injeção (por exemplo, injeção subcutânea ou intravenosa) podem ser formuladas usando uma solução estéril ou qualquer líquido farmaceuticamente aceitável como um veículo. Veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, água estéril, solução salina fisiológica e meio de cultura celular (por exemplo, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Meio de Eagle α-Modificado (α-MEM), meio F-12). Métodos de formulação são conhecidos na técnica, consultar para exemplo, Banga (ed.) *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems* (2ª ed.) Taylor & Francis Group, CRC Press (2006), que é por meio deste incorporado a título de referência em sua totalidade.

[0124] Composições incluindo um polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 podem ser fornecidas a pacientes (por exemplo, seres humanos) tendo deposição de gordura visceral aumentada em combinação com excipientes, portadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis. Excipientes, portadores ou diluentes aceitáveis podem incluir tampões, antioxidantes, preservantes, polímeros, aminoácidos e carboidratos. Excipientes, portadores ou diluentes aquosos podem incluir soluções, emulsões ou suspensões aquosas, aquosas-alcoólicas incluindo solução salina, veículos parenterais médicos tamponados incluindo solução de cloreto de sódio, solução de dextrose de Ringer, solução de dextrose mais cloreto de sódio, solução de Ringer contendo lactose e óleos fixos. Exemplos de excipientes, portadores ou dilu-

entes não aquosos são propileno glicol, polietilenoglicol, óleo vegetal, óleo de peixe e ésteres orgânicos injetáveis.

[0125] Sais farmaceuticamente aceitáveis também podem ser incluídos nas composições de sFGFR3. Sais farmaceuticamente aceitáveis exemplares podem incluir sais de ácido mineral (por exemplo, cloridratos, bromidratos, fosfatos e sulfatos) e sais de ácidos orgânicos (por exemplo, acetatos, propionatos, malonatos e benzoatos). Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsionantes e substâncias tamponantes de pH, podem estar presentes. Um debate criterioso de excipientes, portadores e diluentes farmaceuticamente aceitáveis está disponível em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª Ed., Allen (2012), que é por meio deste incorporado a título de referência em sua totalidade.

[0126] Composições farmacêuticas incluindo um polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 também podem ser formuladas com um portador que protegerá o polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3 contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de liberação microencapsulada. Por exemplo, a composição de sFGFR3 pode ser capturada em microcápsulas preparadas por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, tal como microcápsulas de hidroximetilcelulose, gelatina ou poli-(metilmetacrilato); sistemas de liberação de fármaco coloidal (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas ou nanocápsulas); ou macroemulsões. Adicionalmente, uma composição de sFGFR3 pode ser formulada como uma composição de liberação sustentada. Por exemplo, composições de liberação sustentada podem incluir matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o polipeptídeo ou polinucleotídeo de sFGFR3, em que as matrizes estão na forma de artigos moldados, tais como películas ou microcápsulas.

EXEMPLOS

[0127] Os exemplos seguintes são intencionados a ilustrar, ao invés de limitar, a divulgação.

Exemplo 1:

Projeto de estudo

[0128] Para avaliar o potencial da terapia com sFGFR3 (por exemplo, sFGFR3 tendo a sequência da SEQ ID NO: 1) para prevenir o desenvolvimento de obesidade abdominal em acondroplasia, primeiro caracterizamos o desenvolvimento de obesidade em crianças fazendo-se uma revisão retrospectiva do quadro e depois conduzimos um estudo em camundongos *Fgfr3ach/+*, um modelo de camundongo que recapitula a maioria dos sintomas humanos. Para a revisão do quadro, onze sujeitos (5 meninas e 6 meninos) com acondroplasia foram seguidos desde o nascimento até 18 anos no Department of endocrinology, bone diseases, genetic and medical gynecology of the Purpan Children's Hospital in Toulouse, France. Este estudo de revisão retrospectiva do quadro foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki e as regulações francesas em pesquisa biomédica, não exigindo aprovação do comitê de ética para um estudo não intervencional. Todos os pacientes abrigaram a mutação G380R FGFR3 (G380R se refere à numeração no FGFR3 de tamanho natural, incluindo o peptídeo de sinal; a numeração do resíduo sem o peptídeo de sinal é G358R (consultar SEQ ID NO: 9), foi confirmada por teste molecular. Pacientes recebendo qualquer tratamento para crescimento foram excluídos. As crianças foram seguidas no centro especializado a cada 4 meses em média. Durante cada visita, os dados incluíram a altura, peso e índice de massa corpórea subsequente (IMC = kg/m^2). Análises sanguíneas foram realizadas apenas uma vez por ano e absorciometria de raio X de dupla energia (DXA) foi realizada uma vez. O estudo de camundongo foi realizado em camundongos *Fgfr3ach/+*

transgênicos ou seus irmãos do tipo selvagem (wt). Para isto, as ninhadas foram tratadas cegamente duas vezes por semana por injeções subcutâneas de 2,5 µg/kg de sFGFR3 ou veículo começando no dia 3 até o dia 21. Os camundongos foram desmamados na idade de 3 semanas. Depois de uma semana de aclimatação, os camundongos foram inoculados com dieta normal (ND) ou com alto teor de gordura (HFD) por 10 semanas. O desenvolvimento de obesidade foi avaliado através de medidas da composição corporal, calorimetria indireta e avaliação clássica de perfis de glicose e lipídeo, bem como avaliações da função hepática e pancreática. O *n* por grupo é apresentado nas legendas das figuras.

Análise clínica

[0129] Cálculos antropométricos, incluindo escore z de altura-para-idade e escore z de IMC-para-idade, foram feitos usando o software WHO AnthroPlus (WHO AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009 (www.who.int/growthref/tools/en/); escores z são fundamentados em padrões de WHO (nascimento até 60 meses) e referência 2007 de WHO (61 meses a 19 anos). A composição corporal foi avaliada por DXA usando o dispositivo Lunar Prodigy (GE Healthcare). As regiões de interesse (ROI) para a composição corporal regional foram definidas usando as instruções do fabricante (Fig. 1B). Brevemente, a ROI do tronco foi medida do corte pélvico (limite inferior) ao corte do pescoço (limite superior); a ROI de androide foi medida do corte pélvico (limite inferior) até acima do corte pélvico em 20 % da distância entre os cortes do pescoço e da pelve (limite superior); a ROI do umbigo foi definida do limite inferior do androide em 150 % da distância de androide; e a ROI de ginoide foi do limite inferior da ROI do umbigo a uma linha igual a duas vezes a altura da ROI de androide (limite inferior). Amostras de sangue foram tiradas depois de pelo me-

nos um período de jejum de 12 horas e analisadas no Federative Institute of Biology (IFB) of the Purpan hospital. Concentrações de glicose e insulina, colesterol total, HDL e LDL, triglicerídeo, TGO, TGP, gGT de jejum, bem como bicarbonato, fosfato, cloreto de cálcio, sódio, potássio e fosfatase alcalina totais plasmáticos foram medidas usando métodos colorimétricos ou enzimáticos colorimétricos padrão na série de analisador modular Cobas 8000, usando o módulo C701, da Roche Diagnostics. A concentração sérica de vitamina D de 25OH total foi medida por método de imunoensaio quimioluminescente na série de analisador modular Cobas 8000, usando o módulo E602, da Roche Diagnostics. Todos os valores foram comparados aos valores de referência estabelecidos para cada grupo de idade dentro do Children's hospital e usando-se referências publicadas (Mellerio *et al*., *Pediatrics* 129: e1020 - 1029 (2012); Fischer *et al*., *Ann. Clin. Biochem.* 49:546 - 553, 2012; e Haine *et al*., *J. Bone Miner. Res.* 30:1369 - 1376, 2015). Depois de jejum noturno de 12 h, OGTT foi realizado em pacientes pelas recomendações estabelecidas (Alberti *et al*., *Diabet. Med.* 15:539 - 553, 1998). A seguir da administração oral de 1,75g/kg de glicose, amostras de sangue foram tiradas em valor de referência e depois de 30 e 120 min para medir a concentração de glicose usando método de hexocinase. A regulação da glicose foi avaliada de acordo com as diretrizes da American Diabetes Association: regulação da glicose normal foi definida como glicose de jejum a <5,6 mmol/L e 120 min de glicose a <7,8 mmol/L e glicose de jejum prejudicada como glicose de jejum a 5,6 a 6,9 mmol/L, tolerância à glicose prejudicada como 120 min de glicose a 7,8 a 11,0 mmol/L.

Animais e tratamento

[0130] Os experimentos foram realizados em camundongos Fgfr3ach/+ transgênicos (Naski *et al*., *Development* 125: 4977 - 4988, 1998). No desmame, biópsias auriculares foram usadas para verificar

o genótipo de camundongos por PCR de DNA genômico como previamente descrito (Garcia *et al*., *Science Tradutional Medicine* 5:203ra 124, 2013).

[0131] Durante o experimento, os camundongos foram alojados em condições laboratoriais padrão e foram permitidos acessar alimento e água à vontade. O estudo foi aprovado pelo local Institutional Ethic Committee for the use of Laboratory Animais (CIEPAL Azur) (aprovações # NCE-2012-52 e NCE-2015-225). No dia 3, os camundongos recém-nascidos foram tratados com 2,5 mg/kg de sFGFR3 etiquetado com FLAG como descrito previamente (Garcia *et al*., *Science Traduti-onal Medicine* 5:203ra124, 2013). Ninhadas de controle receberam 10 µl de PBS contendo 50 % de glicerol (veículo). Da idade de 3 dias a 22 dias, os camundongos *Fgfr3ach/+* receberam 6 injeções subcutâneas de sFGFR3 ou veículo. Uma semana depois do desmame em 4 semanas de idade, os camundongos tratados e não tratados foram divididos em dois grupos e inoculados por 10 semanas com dieta normal (ND, A03, SAFE) ou com alto teor de gordura (HFD, 52 % de kcal como gordura, personalizada, contendo 54 % de lipídeos, SAFE), respectivamente. Depois de 6 horas de jejum, o sangue foi tirado da veia caudal. A glicemia foi medida com um glicosímetro (Abbot) e teores de insulina sérica foram determinados por ELISA (Mercodia). Testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados em camundongos depois de 10 semanas de inoculação com ND ou HFD. Depois de 6 horas de jejum os camundongos foram injetados com uma solução de glicose intraperitoneal (1 g/kg). O sangue foi tirado da veia caudal e níveis de glicose foram monitorados com o passar do tempo usando um glicosímetro ou usando o Kit de Ensaio de Glicose EnzyChrom (BioAssay Systems). Níveis de glicose foram normalizados ao valor de tempo -15 min de cada camundongo.

[0132] Calorimetria indireta foi estudada em camundongos inocu-

lados por 10 semanas com dieta normal (ND) ou com alto teor de gordura (HFD). Como estabelecido acima, os camundongos foram tratados durante o período de crescimento com 2,5 mg/kg de sFGFR3 ou veículo, foram submetidos à inoculação de dieta por 2 semanas e depois foram submetidos às câmaras metabólicas. Depois de 24 h de aclimatação em gaiolas metabólicas individuais, o consumo de O2 (VO2) e a produção de CO2 (VCO2) foram medidos (Oxilet; Panlab-Bioseb) em camundongos individuais em intervalos de 32 min durante um período de 24 h com acesso irrestrito a alimento seguido por uma noite de jejum. O quociente respiratório foi calculado e analisado como segue: RQ = VCO2/VO2, RQ = 1 correspondem à oxidação de carboidrato e RQ~0,7 correspondem à oxidação de gordura. Gasto energético (kcal/dia/pesox0,75=1,44x VO2x[3,815+1,232xRQ]), oxidações de carboidrato (g/min/kg0,75= [4,55xVCO2]-[3,21xVO2]) e lipídeo (g/min/kg0,75=[1,67xVO2]-[1,67x VCO2]) foram calculados. As atividades ambulatórias e a criação dos camundongos foram monitoradas por uma tecnologia de transdutor de peso ou um método de interrupção de feixe de fotocélula no infravermelho (Oxilet; Panlab-Bioseb).

[0133] A composição corporal foi determinada usando um sistema micro-CT de raio X SkyScan 1178. Os camundongos de quatro e 10 semanas de idade foram anestesiados e varridos usando os mesmos parâmetros: 104 µm de tamanho por pixel, 49 kV, 0,5 mm de filtro de alumínio espesso, 0,9° de tapa de rotação. O volume de tecido adiposo total foi determinado entre a ponta do focinho e o topo da cauda e o volume de tecido adiposo abdominal foi determinado entre a L1 lombar e a S1 sacral. Depois, a quantificação de tecido adiposo foi realizada mais precisamente. A análise da composição corporal é fundamentada na delimitação da região de interesse depois de reconstrução 3D de imagens varridas. Análises de reconstruções 3D foram realizadas usando o software NRecon e CTAn (Skyscan).

[0134] No sacrifício, os animais foram pesados e vários tecidos e órgãos (tecido adiposo subcutâneo, epididimal, fígado, pâncreas) foram colhidos para análise adicional por histoquímica ou qPCR. Em alguns grupos, células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea foram colhidas injetando-se os fêmures (Zhu *et al*., *Nat Protoc* 5:550 - 560, 2010).

[0135] O perfil lipídico foi avaliado tomando-se o sangue intracardíaco. Colesterol total, triglicerídeos (TG), Lipoproteína de alta densidade (HDL) e Lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram medidos no soro usando um Analisador Beckman AU 2700. Os soros foram analisados quanto aos níveis de proteína de adipocinas selecionadas relacionados à inflamação, obesidade, via de insulina ou FGFs usando o Arranjo de Adipocina de Camundongo (#ARY013, R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante em membranas de nitrocelulose. A seguir da detecção de estreptavidina-HRP e de quimioluminescência as proteínas ligadas a cada anticorpo capturado foram quantificadas usando densitometria e níveis foram comparados à porcentagem de mudança de camundongos WT.

Estudos de célula-tronco mesenquimal

[0136] Células-tronco mesenquimais foram isoladas da medula óssea femoral fornecidas de camundongos de 6 a 8 semanas de idade não tratados ou tratados com sFGFR3 injetando-se os fêmures (Zhu *et al*., *Nat. Protoc.* 5:550 - 560, 2010) e cultivada a 80 % de confluência em meio suplementado com 10 % de soro. Depois, o meio foi substituído com meio adipogênico (DMEM F12 suplementado com 2 % de soro, 1 % de antiobióticos, 66 mM de insulina, 1 nM de triiodotironina, 100 mM de cortisol, 10 µg/ml de transferrina e 3 µM de rosiglitazona em DMEM-F12). Os RNAs totais foram extraídos usando Reagente Trizol (Life Technologies) e Clorofórmio (Sigma). Um micrograma de RNA total foi transcrito reverso em cDNA usando hexâmetros aleató-

rios e o kit de Transcriptase Reversa Superscript II (Invitrogen). qPCR em tempo real foi realizada em um StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com Fast SYBR Green Master Mix (Sigma) usando um RT2 Profiler PCR Array (CAPM13080) habitual. Os genes estudados são listados na Tabela 1. A expressão do gene foi normalizada para gene de manutenção HPRT, RPL13a e RPL6. A expressão de FGFRs foi realizada usando os iniciadores seguintes: FGFR1, For-5' CAGATGCACTCCCATCCTCG 3' Rev-5' TCT GGGGATGTCCAG-TAGGG 3'; FGFR2 For-5' TGGCAGTGAAGATGTTGAAAG 3' Rev-5' ATCATCTTCATCATCTCCATCTCTTG 3'; FGFR3 For-5' TTATCC TTGGCTCCTGGGTG 3' Rev-5' CTGGAAGGTAGCAGTGGGAA 3'; FGFR4 For-5' GCTCGGAGGTAGAGGTC TTGT 3' Rev-5' CCACG-CTGACTGGTAGGAA 3'; HSP90 For-5' TTTGG TGGACACAGG-CATTG 3' Rev-5' CAAACTGCCCGATCATGGAG 3'.

Tabela 1. Lista de genes estudados usando RT2 Profiler PCR Array habitual em células-tronco mesenquimais.

Símbolo do Gene	Nome Completo Oficial	# de Refseq
Adipoq	Contendo domínio de adiponectina, C1Q e colágeno	NM_009605
Cebpa	CCAAT/proteína de ligação a realçador (C/EPB), alfa	NM_007678
Cebpb	CCAAT/proteína de ligação a realçador (C/EPB), beta	NM_009883
Cebpd	CCAAT/proteína de ligação a realçador (C/EPB), delta	NM_007679
Dlk1	Homólogo 1 semelhante a Delta (Drosophila)	NM_010052
Fabp4	Proteína 4 de ligação a ácido graxo, adipócito	NM_024406
Fasn	Ácido graxo sintase	NM_007988
Gata3	Proteína 3 de ligação a GATA	NM_008091
Hptr	Hipoxantina guanina fosforribosil transferase	NM_013556
Lep	Leptina	NM_008493
Lipe	Lipase, sensível a hormônio	NM_010719
Lpl	Lipoproteína lipase	NM_008509
Pparg	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma	NM_011146
Ppargc1a	Receptor ativado proliferativo de peroxissoma, gama, coativador 1 alfa	NM_008904
Rpl13a	Proteína ribossômica L13a	NM_009438
Rpl6	Proteína ribossômica L6	NM_011290
Scd1	Estearoil-Coenzima A dessaturase 1	NM_009127
Slc2a4	Família 2 de portador solúvel (transportador de glicose facilitado),	NM_009204

Símbolo do Gene	Nome Completo Oficial	# de Refseq
	membro 4	
Srebt1	Fator 1 de transcrição de ligação de elemento regulador de esterol	NM_011480
Ucp1	Proteína 1 que não de ligação (portador de próton, mitocondrial)	NM_009463
Wnt1	Sítio 1 de integração de MMTV relacionado a Wingless	NM_021279

[0137] Para experimentos de sinalização de insulina, 24 h depois do isolamento, as células foram suprimidas durante 6 h e depois estimuladas com 50 nM de insulina por 0, 5, 15, 30 min ou com 0, 1, 10, 50, 100 nM por 5 min. Os extratos de células foram processados para análise de Western Blot. Para isto, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Millipore) e homogeneizadas a partir de 30 min usando um turbilhão. Proteínas foram peletizadas por centrifugação de 1400 g a partir de 15 min e teores de proteína total foram avaliados usando o BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). Amostras foram diluídas em Sample Reducing Buffer (Life Technology), fervidas e processadas para imunomanchamento usando-se um procedimento padrão. Os anticorpos monoclonais foram usados como segue: anti p44/42 MAPK (Erk1/2) (4695S, Cell Signaling), anti fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204) (4370S, Cell Signaling). Os resultados foram normalizados para a expressão de HSP90 (4877S, Cell Signaling).

Histologia e imuno-histoquímica

[0138] Análises histológicas foram realizadas em tecido adiposo, fígado e pâncreas de camundongos de 12 semanas de idade. Os órgãos foram fixados em 4 % de formalina por 24 h, embutidos em parafina e seções de 5 µm são manchadas com hematoxilina e eosina. Diâmetros de adipócito foram medidos em uma ou duas seções diferentes em cada amostra (de 100 a 300 adipócitos foram contados em cada seção).

[0139] Os números e a área de ilhotas pancreáticas foram medidos em uma seção usando o sistema Fiji Image J (a área da ilhota foi normalizada à área total do pâncreas). O teor de glicogênio hepático foi avaliado por manchamento com Ácido periódico-Shiff (PAS). Imu-

noistoquímica foi realizada em seções de 5 µm de pâncreas. Seções foram bloqueadas 45 min com PBS a 1 % de BSA, incubadas durante a noite com anticorpo primário monoclonal anti-insulina (4 µg/ml) (Santa Cruz, sc-9168), anticorpo policlonal anti-glucagon (4 µg/ml) (Santa Cruz, sc-7779) e 1 h com anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (2 µg/ml) (Life Technologies, A-21442) e anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (4 µg/ml) (Life Technologies, A-21467) em câmara úmida. As seções foram contra-manchadas com solução de DAPI (Santa Cruz), tratada com reagente de eliminador de autofluorescência e visualizada sob microscopia de fluorescência. Manchamento sem anticorpo secundário foi usado como um controle negativo.

Análise estatística

[0140] Análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism 6.0. Os dados foram expressados como média ± SD. Para verificar a normalidade e variância igual, um teste de normalidade generalizada de Agostino e Pearson (a = 0,05), um teste de normalidade de Shapiro-Wilk (a = 0,05) e um teste de normalidade de KS (a = 0,05) foram realizados. A significância foi determinada usando-se teste t de Student bicaudal ou teste de comparação múltipla de Tukey não pareados. Em pacientes, os resultados brutos de altura e IMC foram transformados para escore z específico de idade da média na população de referência usando dados de referência. O resultado médio esperado destes valores em uma população saudável é 0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativo (* $P< 0,05$; ** $P< 0,01$; *** $P< 0,001$).

Exemplo 2:

Pacientes com acondroplasia desenvolvem um excesso de tecido adiposo abdominal sem complicações clássicas

[0141] Sujeitos foram crianças e adolescentes com acondroplasia. Eles foram incluídos em um estudo retrospectivo, longitudinal conduzido pelo mesmo observador para uma média de 8,6 ± 5,6 anos. Medi-

das antropométricas e composição corporal foram registradas desde o nascimento durante as visitas de acompanhamento e comparadas entre a variação de três grupos de idade de [0 a 3], [4 a 8] e [9 a 18] anos. Vários parâmetros sanguíneos metabólicos foram medidos e comparados nos diferentes grupos de idade. Valores sanguíneos para visitas abaixo da idade de 3 não foram consideradas por causa da dificuldade de restringir o consumo de alimento em infantes e assim controlar os parâmetros metabólicos nesta idade jovem.

[0142] É conhecido que pacientes com acondroplasia não apenas exibem crescimento prejudicado, mas que eles também têm uma tendência a ganhar peso excessivo levando a sobrepeso ou ainda obesidade (Hoover-Fong *et al.*, *Am. J. Med. Genet. A.* 143A:2227 - 2235, 2007). Como observado na Fig. 1A, o IMC de pacientes com acondroplasia aumentou significativamente durante a infância, até atingir um valor de cerca de 30 kg/m2 no grupo de [9 a 18] anos (P = 0,2407 entre grupos [0 a 3] e [4 a 8], P<0,0001 comparando o grupo de [9 a 18] a ambos os outros grupos, teste de comparação múltipla de Tukey). Uma correlação negativa foi observada entre IMC e altura (coeficiente r de Pearson = -0,5660, P = 0,0021), com uma tendência para as crianças menores terem o IMC mais alto. Para estudar seu estado metabólico e sua evolução, análises densitométricas foram primeiro realizadas para determinar a distribuição de massa gorda e massa magra corporal nos diferentes grupos de idade (Fig. 1B). Observamos que até 8 anos de idade, a razão de massa gorda:magra total foi relativamente constante e que ela elevou significativamente durante a adolescência, de 0,21 ± 0,02 e 0,20 ± 0,05 nos grupos de [0 a 3] e [4 a 8] de idade a 0,84 ± 0,29 no grupo de [9 a 18] de idade, respectivamente (P = 0,9954 entre os grupos [0 a 3] e [4 a 8], P = 0,0053 e P<0,0001 comparando [9 a 18] aos grupos [0 a 3] e [4 a 8] de idade, respectivamente, teste de comparação múltipla de Tukey) (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da densitometria de pacientes com acondroplasia nos três grupos de idade. Valores são média ± SD (faixa). Os valores de p representam a significância da diferença entre os três grupos (um teste ANOVA de uma via seguido por teste de comparação múltipla de Tukey, ns = não significativo). Resultados de análises post hoc: a significativamente diferente entre os grupos [0 a 3] e [4 a 8]; b significativamente diferente entre os grupos [0 a 3] e [9 a 18]; c significativamente diferente entre os grupos [4 a 8] e [9 a 18].

Idade (anos)	[0-3]		[4-8]		[9-18]			
Variáveis	Média ± SD	Faixa (min-max)	Média ± SD	Faixa (min-max)	Média ± SD	Faixa (min-max)		
Repartições de massa gorda e magra (kg)							p	
Massa gorda corporal total	1.52 ± 0.32	(1.29-1.76)	2.64 ± 0.73	(1.98-4.06)	19.78 ± 7.98	(6.56-30.15)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra corporal total	0.88 ± 0.04	(0.86-0.91)	0.84 ± 0.09	(0.75-0.90)	0.46 ± 0.01	(0.46-0.68)	0.001	a,b,c
Massa do tronco	3.67 ± 0.45	(3.38-4.02)	6.93 ± 1.46	(4.83-8.68)	21.19 ± 5.53	(14.08-28.72)	< 0.0001	a,b,c
Massa gorda do tronco	0.41 ± 0.12	(0.32-0.49)	0.83 ± 0.44	(0.23-1.64)	9.74 ± 4.42	(3.97-15.65)	0.001	a,b,c
Massa magra do tronco	3.29 ± 0.33	(3.06-3.53)	6.11 ± 1.15	(4.35-7.08)	11.4 ± 1.50	(9.67-13.42)	< 0.0001	a,b,c
Massa da perna	1.77 ± 0.28	(1.57-1.97)	4.61 ± 1.29	(3.12-7.21)	13.89 ± 3.36	(8.86-18.24)	< 0.0001	a,b,c
Massa gorda da perna	0.65 ± 0.12	(0.57-0.73)	1.22 ± 0.31	(0.86-1.69)	7.46 ± 2.61	(3.39-10.72)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra da perna	1.11 ± 0.16	(0.99-1.23)	3.39 ± 1.04	(2.26-5.52)	6.31 ± 0.98	(4.81-7.51)	< 0.0001	a,b,c
Massa do braço	0.65 ± 0.04	(0.62-0.68)	1.21 ± 0.23	(0.99-1.53)	3.74 ± 1.03	(2.38-5.12)	< 0.0001	a,b,c
Massa gorda do braço	0.09 ± 0.06	(0.08-0.10)	0.21 ± 0.09	(0.12-0.35)	1.57 ± 0.76	(0.56-2.54)	0.004	a,b,c
Massa magra do braço	0.56 ± 0.04	(0.53-0.58)	0.99 ± 0.18	(0.66-1.18)	2.16 ± 0.34	(1.62-2.65)	0.001	a,b,c
Repartições de massa gorda e magra (% de peso corporal total)								
Massa gorda corporal total	19.04 ± 0.74	(18.51-19.57)	16.08 ± 3.10	(11.86-21.40)	42.93 ± 9.11	(28.36-52.89)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra corporal total	88.29 ± 3.51	(85.81-90.77)	83.89 ± 9.25	(74.75-90.43)	46.19 ± 0.79	(45.63-68.49)	< 0.0001	a,b,c
Massa do tronco	46.47 ± 2.57	(44.64-48.29)	47.26 ± 4.08	(28.42-50.15)	50.35 ± 0.06	(45.00-50.40)	ns	
Massa gorda do tronco	5.01 ± 0.64	(4.56-5.46)	5.60 ± 1.74	(1.37-8.65)	27.11 ± 0.50	(13.16-27.46)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra do tronco	41.47 ± 3.22	(39.19-43.74)	41.66 ± 5.82	(27.05-45.78)	23.24 ± 0.44	(22.71-33.47)	0.004	a,b,c
Massa da perna	22.14 ± 0.37	(21.88-22.40)	25.22 ± 0.28	(25.03-42.45)	31.13 ± 1.24	(29.68-32.32)	0.0285	c
Massa gorda da perna	8.17 ± 0.02	(8.16-8.19)	6.94 ± 0.87	(5.95-9.95)	18.05 ± 1.08	(11.23-19.32)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra da perna	13.97 ± 0.40	(13.69-14.26)	18.28 ± 0.60	(17.64-32.50)	13.07 ± 0.16	(12.96-18.44)	0.0122	c
Massa do braço	8.21 ± 0.88	(7.59-8.83)	7.33 ± 0.21	(6.66-8.07)	8.89 ± 0.14	(7.60-8.99)	0.0032	c
Massa gorda do braço	<0.001	(10^{-6}-10^{-6})	1.08 ± 0.42	(0.78-1.88)	4.40 ± 0.09	(1.86-4.46)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra do braço	7.05 ± 0.76	(6.51-7.59)	6.25 ± 0.21	(5.44 ± 6.60)	4.49 ± 0.23	(4.25-6.04)	0.0005	a,b,c
Composição de corpo ginoide e androide (% de tecido total)								
Gordura de corpo ginoide	43.75 ± 0.07	(43.70-43.80)	33.97 ± 3.00	(29.30-38.40)	52.91 ± 6.37	(40.60-58.80)	0.0007	c
Gordura de corpo androide	13.45 ± 3.47	(11.00-15.90)	14.73 ± 4.02	(8.90-19.50)	44.79 ± 11.39	(29.90-55.90)	< 0.0001	a,b,c
Massa magra de corpo ginoide	56.25 ± 0.07	(56.20-56.30)	67.52 ± 4.70	(60.90-74.91)	47.10 ± 6.38	(40.50-58.70)	ns	
Massa magra de corpo androide	86.6 ± 3.40	(84.20-89.00)	85.27 ± 3.97	(80.52-91.07)	55.21 ± 11.39	(44.10-69.20)	ns	

[0143] Interessantemente, como observado na Fig. 1C, o aumento na massa gorda não foi homogêneo e pacientes preferencialmente desenvolveram massa gorda abdominal (androide) (+204 %) sobre a massa gorda do quadril (ginoide) (+55 %) (P = 0,0974 entre os grupos [0 a 3] e [4 a 8], P = 0,0002 e P = 0,001 comparando [9 a 18] aos grupos [0 a 3] e [4 a 8] de idade, respectivamente, teste de comparação

múltipla de Tukey). Concorrentemente, tanto as massas magras de androide quanto de ginoide não variaram durante este período (Tabela 1). Consequentemente, a razão de gordura:massa magra aumentou significativamente na área abdominal por toda a infância (P = 0,3187 entre os grupos [0 a 3] e [4 a 8], P = 0,0924 e P<0,0001 comparando [9 a 18] aos grupos [0 a 3] e [4 a 8] de idade, respectivamente, teste de comparação múltipla de Tukey). O tronco, pernas e braços seguiram uma tendência muito similar com um aumento na porcentagem de massa gorda e diminuição na porcentagem de massa magra da infância à maioridade (Tabela 1). A densidade mineral do osso espinhal (BMD) foi determinada entre L1 e L4 depois da idade de 3. Em ambos os grupos de idade, BMD foi descoberta estar abaixo do valor normal da faixa apropriada para idade (van der Sluis *et al*., *Arch. Dis. Child.* 87:341 - 347, 2002) (0,511 ± 0,065 g/cm2 e 0,898 ± 0,223 g/cm^2 nos grupos [4 a 8] e [9 a 18] de idade, respectivamente, comparado a 0,645 ± 0,071 g/cm2 e 0,913 ± 0,199 g/cm2 nos grupos referenciados da mesma idade).

[0144] Diferentes parâmetros sanguíneos foram comparados entre os grupos [4 a 8] e [9 a 18] de idade. Inesperadamente, em ambos os grupos de idade e independentemente de seu IMC, crianças acondroplasias exibiram uma tendência a colesterol total plasmático baixo (3,38 ± 0,36 mmol/L e 3,73 ± 0,44 mmol/L nos grupos [4 a 8] e [9 a 18] de idade, respectivamente, com valores normais sendo compreendidos entre 3,90 e 5,70 mmol/L em crianças) e triglicerídeos baixos (0,56 ± 0,14 mmol/L e 0,63 ± 0,13 mmol/L nos grupos [4 a 8] e [9 a 18] de idade, respectivamente, com valores normais sendo compreendidos entre 0,60 e 1,70 mmol/L em crianças). Similarmente, níveis de glicose (Fig. 1D) e insulina sanguíneos de jejum não estavam aumentando com a idade e permaneceram dentro da faixa normal (7,3 ± 5,4 mUI/L e 13,4 ± 3,4 mUI/L nos grupos [4 a 8] e [9 a 18] de idade, respectiva-

mente, com valores normais sendo compreendidos entre 2,6 e 16 mUI/L em crianças). Estes resultados foram confirmados por níveis de glicose obtidos durante o teste de tolerância à glicose oral (OGTT), que mostrou níveis de glicose normais em 0, 30 e 120 minutos a seguir da administração oral (4,53 ± 0,22 mmol/l em 0 min, 7,97 ± 1,72 mmol/l em 30 min e 5,17 mmol/l em 120 min). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre ambos os grupos de idade. Devido aos níveis altos de hemólise durante o OGTT, infelizmente, nenhum dado estava disponível com respeito aos níveis de insulina.

[0145] Todos os outros parâmetros sanguíneos estavam dentro da faixa normal (dados não mostrados).

Alterações metabólicas são observadas em camundongos Fgfr3ach/+ magros e obesos e são corrigidas por tratamento com sFGFR3

[0146] Para determinar o papel de FGFR3ach neste desenvolvimento preferencial de obesidade visceral em acondroplasia, camundongos *Fgfr3ach/+* transgênicos portando a mutação G380R ou seus irmãos do tipo selvagem (wt) foram tratados com sFGFR3 ou veículo por 3 semanas começando no dia 3. Os camundongos foram depois inoculados com dieta normal (ND) ou com alto teor de gordura (HFD) começando em 4 semanas de idade por uma duração de 10 semanas para avaliar o desenvolvimento da obesidade.

[0147] Depois do desmame, em 4 semanas de idade, como esperado, os camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados tiveram uma diminuição de 20,4 % no peso corpóreo comparado aos seus irmãos WT. Isto foi associado com os tecidos magros e adiposos reduzidos (50 % e 33,9 % respectivamente). Os animais tratados exibiram uma diminuição de 14,1 % no peso corpóreo comparado aos camundongos WT ($P<0,0001$).

[0148] Depois de 10 semanas de inoculação de dieta, todos os grupos de HFD mostraram um aumento significativo no peso corpóreo

comparado a ND (Fig. 2A). Interessantemente, entretanto, a composição corporal foi diferente em ambos os genótipos. Camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados tiveram uma razão de massa magra:gordura abdominal mais alta, medida entre L1 e S1, comparados aos camundongos WT, independentemente da dieta (Fig. 2B). Quando alimentados com ND, os camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados tiveram menos tecidos adiposos epididimais (visceral) e subcutâneos do que os animais WT (FIGURAS 2C e 2D). Entretanto, depois de 10 semanas de inoculação com HFD, os camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados desenvolveram mais tecido adiposo epididimal comparado aos animais WT que preferencialmente desenvolveram depósito de gordura subcutânea (Fig. 2C e 2D). Estes dados mostraram que, semelhante aos pacientes com acondroplasia, camundongos *Fgfr3ach*/+ estavam propensos a desenvolver tecido adiposo visceral.

[0149] O tratamento com sFGFR3 não tem nenhum efeito sobre o ganho de peso corpóreo (Fig. 2A). Entretanto, a composição corporal foi significativamente impactada por tratamento com sFGFR3 com uma diminuição significativa em razão de massa magra:gordura abdominal em camundongos alimentados com ND (Fig. 2B), causada por uma diminuição em massas magras e um aumento em massas gordas respectivamente. Muito interessantemente, camundongos *Fgfr3ach*/+ tratados com sFGFR3 exibiram distribuições de depósito de gordura que foram semelhantes àqueles de animais WT se eles fossem alimentados com ND ou HFD (FIGURAS 2C e 2D).

[0150] Depois da inoculação com HFD, as análises histológicas mostraram adipócitos menores na área subcutânea e uma maior proporção destes adipócitos pequenos em camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados comparados a WT (FIGURAS 2E e 2G). Nenhuma diferença no tamanho ou dispersão foi observada em adipócitos epididimais entre ambos os genótipos (FIGURAS 2F e 2H). O tratamento com

sFGFR3 restaurou o tamanho e dispersão de adipócitos subcutâneos e induziu um leve aumento no tamanho de adipócito epididimal (Fig. 2E a 2H). Porque a proporção aumentada de células adiposas pequenas foi associada com a inflamação (Kursawe *et al*., *Diabetes* 59: 2288 - 2296, 2010; e Lafontan, *Diabetes Metab.* 40:16 - 28, 2014), várias adipocinas circulantes foram medidas para avaliar a extensão da inflamação sistêmica nestes animais (FIGURAS 6A e 6B). Adipocinas foram classificadas em quatro categorias - pró-inflamatórias, relacionadas à obesidade, via de insulina e FGFs - todas as quais foram aumentadas em camundongos transgênicos comparados aos irmãos WT (Tabela 3). Camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados exibiram um valor de referência inflamatório de grau baixo comparados aos animais WT, que foi exacerbado sob inoculação com HFD (Tabela 3). Os animais Fgfr3ach/+ tratados sob ND ou HFD tem um perfil sistêmico que se assemelhou àquele de seus irmãos WT. Células-tronco mesenquimais (MSCs), *in vitro* isoladas de camundongos *Fgfr3ach/*+ mostraram que genes iniciais e intermediários do processo de diferenciação tais como Srebf-1, CEBP/d, CEPB/a e PPARg já foram expressados (Fig. 3A). Muito interessantemente, MSCs isoladas de camundongos *Fgfr3ach/*+ tratados com sFGFR3 mostraram aumento significativo em marcadores antiadipogênicos e marcadores de ativação de tecido da testa bem como expressão diminuída de genes envolvidos nas funções de adipócitos maduros (Fig. 3A). Junto com os dados *in vivo*, isto sugere uma predisposição à adipogênese em camundongos *Fgfr3ach/*+ que pode ser prevenida por tratamento com sFGFR3.

Tabela 3. Camundongos $Fgfr3^{ach/+}$ não tratados exibiram um valor de referência inflamatório elevado prevenido por tratamento com sFGFR3. Expressão de adipocinas circulantes pró-inflamatórias, de obesidade, via de insulina e FGF em camundongos WT e $Fgfr3^{ach/+}$ tratados com veículo e $Fgfr3^{ach/+}$ tratados com sFGFR3 depois de 10

semanas de inoculação de ND ou HFD; '-' = <2 unidades arbitrárias (A.U.), '+' = 10 a 30 A.U., '++' = 30 a 100 A.U., '+++' > 100 A.U.

	ND			HFD		
	WT	*Fgfr3*$^{ach/+}$		WT	*Fgfr3*$^{ach/+}$	
Marcadores (n)	veículo	veículo	2,5 mg/kg de sFGFR3	veículo	veículo	2,5 mg/kg de sFGFR3
Pró-inflamatório (14)	+	++	+	+	++	+
Obesidade (15)	++	+++	+	++	+++	++
Via de insulina (7)	++	++	++	++	+++	++
FGF (2)	+	+	-	-	++	-

[0151] Comparados aos seus irmãos WT, camundongos portando a mutação FGFR3 tiveram glicemia de jejum baixa e níveis de valor de referência muito baixos de insulina (Fig. 4A). Quando inoculados com uma dieta de HFD (Fig. 4B), níveis glicêmicos elevaram mas permaneceram abaixo daqueles dos animais WT. Níveis de insulina permaneceram extremamente baixos. Em animais *Fgfr3ach*/+ tratados com sFGFR3, a glicemia foi restaurada e níveis de insulina aumentaram significativamente comparados aos camundongos Fgfr3ach/+ não tratados (FIGURAS 4A e 4B).

[0152] Para avaliar o desenvolvimento de intolerância à glicose, testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados depois de 10 semanas de inoculação de dieta. Camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados exibiram níveis mais altos de glicose e AUC comparados aos seus irmãos WT (Cmax 320,9 ± 32,0 mg/dL e 273,3 ± 23,9 mg/dL, AUC 1,2x104 ± 0,7x104 e 1,7x104 ± 0,4x104, respectivamente), o que mostra alguma intolerância à glicose basal mesmo sob ND. Isto foi ainda mais exacerbado sob HFD (Fig. 4C). Quando camundongos *Fgfr3ach*/+ foram tratados com 2,5 mg/kg de sFGFR3, respostas de GTT normais foram restauradas (Fig 4C). Tentamos realizar o teste de tolerância à insulina em camundongos transgênicos sob ND ou HFD mas, por causa de seus níveis glicêmicos basais mais baixos, os camundongos *Fgfr3ach*/+ não suportaram a injeção de insulina e morre-

ram rapidamente. A análise da sensibilidade à insulina de células-tronco mesenquimais isoladas de camundongos *Fgfr3ach*/+ ou WT não mostrou nenhuma diferença em níveis de fosforilação de Erk1/2 sugerindo resposta similar à estimulação de insulina em ambos os tipos de camundongos (Fig. 3B). Estes resultados sugerem que camundongos *Fgfr3ach*/+ não parecem mais sensíveis à regulação de insulina mas esta injeção de insulina durante o ITT provavelmente induziu a hipoglicemia letal por causa de sua glicemia basal baixa. Análises do pâncreas mostraram ilhotas de Langerhans menores e maiores com teores de insulina e glucagon mais baixos em camundongos *Fgfr3ach*/+ não tratados (Fig. 4D) sugerindo uma alteração da produção e/ou armazenamento de insulina. Isto foi parcialmente restaurado em animais tratados (FIGURAS 3B e 4A a 4C). O armazenamento de glicose também pareceu prejudicado no fígado de animais *Fgfr3ach*/+ não tratados como observado pela diminuição no glicogênio em seções do fígado (Fig. 4E). Como esperado, a seguir de 10 semanas de inoculação com HFD, camundongos WT desenvolveram esteatose macrovesicular de grau III com mais do que 75 % de hepatócitos exibindo vacúolos lipídicos que foram maiores do que o núcleo (Fig. 4E). Ao contrário, depois de 10 semanas de HFD, os camundongos *Fgfr3ach*/ + não tratados desenvolveram nódulos hepáticos benignos reversíveis (Fig. 4F) e uma esteatose microvesicular de grau II: menos do que 50 % de hepatócitos exibiram vacúolos pequenos (Fig. 4E). Interessantemente, o tratamento com sFGFR3 restaurou uma resposta hepática normal em camundongos *Fgfr3ach*/+ tratados (Fig. 4E) e nenhum nódulo foi observado.

[0153] A taxa metabólica de energia basal de camundongos *Fgfr3ach*/+ foi avaliada por calorimetria indireta. Descobrimos que embora animais WT magros alimentados com dieta normal (ND) tirassem energia de fontes de carboidrato (quociente respiratório RQ perto de

1), os camundongos transgênicos alimentados com acondroplasia tiraram sua energia essencialmente de fontes lipídicas (RQ perto de 0,7) (Fig. 5A). No episódio de jejum, como esperado, ambos os tipos de animais tiraram sua energia de fontes lipídicas. Esta utilização de lipídeo preferencial foi confirmada pelo cálculo de oxidação de carboidrato e lipídeo, que foi respectivamente mais baixo e mais alto em camundongos *Fgfr3ach*/+ comparados aos animais WT (Fig. 5B). Acima de um período de 24 horas, os camundongos *Fgfr3ach*/+ tendem a comer constantemente não apenas durante o período noturno, entretanto o gasto energético e o consumo de alimento não foram significativamente diferentes entre ambos os genótipos (FIGURAS 7A a D). Como esperado sob HFD, todos os animais tiraram sua energia de fontes lipídicas, levando a índices de oxidação de carboidrato e lipídeo similares (FIGURAS 5C a D, FIGURAS 7E a H). Muito interessantemente, os animais *Fgfr3ach*/+ que receberam tratamento com sFGFR3 durante o período de crescimento se comportaram como camundongos WT não tratados depois do desmame se eles fossem alimentados com ND ou HFD, sugerindo as capacidades de restauração do metabolismo da glicose durante o período de tratamento (Fig. 5 e FIGURAS 7A a H).

[0154] Variações na deposição de tecido adiposo nos diferentes sítios corporais podem ser avaliadas para avaliar a severidade de obesidade em acondroplasia. Comparada a escores z de IMC e medições de dobra na pele, a razão de androide:ginoide está intimamente relacionada a todos os fatores de risco em crianças com sobrepeso e obesas. Em acondroplasia, crianças exibem razão de androide:ginoide mais alta que desenvolve muito precocemente durante a infância. Nossas descobertas em camundongos *Fgfr3ach/*+ sugere uma predisposição à obesidade visceral preferencial nestes pacientes. De fato, células derivadas da linhagem mesenquimal pareceram mais propen-

sas à adipogênese do que células isoladas de animais WT e parecem pré-engajadas no processo de diferenciação para adipócitos. Além disso, distribuição de adipócito diferente foi observada com uma maior proporção de adipócitos pequenos no tecido adiposo subcutâneo de camundongos *Fgfr3ach/+* comparados aos animais WT. O número de células adiposas é ajustado durante a infância e adolescência e permanece constante durante a maioridade. A obesidade em pacientes com acondroplasia pode ser ajustada muito precocemente durante a infância e o monitoramento tão precoce quanto em 4 a 8 anos usando, por exemplo, varreduras de DXA, pode ser autorizado.

[0155] O desenvolvimento de uma obesidade abdominal é usualmente considerado como sendo o tipo mais deletério de obesidade (Smith, *J. Clin. Invest.* 125:1790 - 1792, 2015). Nossos resultados sugerem que a obesidade abdominal é provavelmente uma consequência da mutação que afeta FGFR3. Correntemente, três membros da família de FGFs foram ligados à obesidade (Nies *et al*., *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6:193, 2015): FGF1, FGF15/19 e FGF21. FGF1 é regulado por PPARg e é notavelmente altamente supra-regulado em WAT (*28*). O FGF1 é conhecido promover a proliferação e diferenciação pré-adipócito através de sinalização de Erk1/2. Ele também desencadeia efeito de redução sanguínea aguda que parece ser dependente da sinalização de FGFR2 em WAT. FGF15/19 é considerado como um regulador das respostas alimentares. Ele se liga ao complexo de receptor FGFR4/ bklotho na membrana celular de hepatócitos finalmente levando à repressão de gliconeogênese (Tomlinson *et al*., *Endocrinology* 143:1741 - 1747, 2002). FGF21 principalmente se liga a FGFR1 e regula a resposta de jejum adaptativa através de PPARa (Kharitonenkov *et al*., *J. Clin. Invest.* 115:1627 - 1635, 2005). Em camundongos *Fgfr3ach/+*, a superexpressão de FGFR3ach durante a embriogênese pode modificar a sinalização de FGFs em diferentes

tipos de células. De acordo com isto, descobrimos que células-tronco mesenquimais de camundongos *Fgfr3ach/+* expressam níveis altos de FGFR3 comparados aos seus irmãos WT. Similarmente, camundongos *Fgfr3ach/+* recém-nascidos expressam níveis aumentados de FGFR2 e FGFR4 em AT e fígado. No geral, estes dados podem explicar a glicemia baixa associada com obesidade abdominal em camundongos *Fgfr3ach/+*. Ao longo desta linha, também observa-se que pacientes ainda tenderam a glicemia de jejum e insulinemia mais baixas e nenhum paciente teve intolerância à glicose, sugerindo que mecanismos similares podem se aplicar no ser humano.

[0156] O tratamento com sFGFR3 foi aplicado imediatamente depois do nascimento e preveniu a maioria das complicações metabólicas, incluindo o desenvolvimento de obesidade abdominal. Camundongos *Fgfr3ach/+* tratados não foram protegidos contra obesidade *por si* mas se comportaram essencialmente semelhante aos animais WT com o desenvolvimento de obesidade homogênea e a restauração do metabolismo da glicose levando à resistência à glicose sob HFD. Isto sugere que, se aplicado precocemente em vida, o tratamento pode reverter o efeito da mutação Fgfr3ach nestes tecidos metabólicos atípicos.

[0157] Em conclusão, os dados estabelecem que o desenvolvimento de uma obesidade não conforme é preferencialmente abdominal e parece ser desencadeado pela mutação de FGFR3. Os dados também indicam que o tratamento para pacientes acondroplásicos tendo deposição de gordura visceral anormal pode ser aplicado a outras populações de pacientes com deposição de gordura visceral anormal e condições derivadas desta. Pacientes tendo transtornos de retardo do crescimento esquelético podem ser tratados para controlar a deposição de gordura visceral anormal e condições associadas com esta, por exemplo, depois da conclusão do crescimento ósseo quando

polipeptídeos de sFGFR3 não seriam, de outro modo, considerados uma terapia relevante. Pacientes também podem se beneficiar de monitoramento para co-morbidezes de obesidade, tais como riscos de diabete e CVS.

OUTRAS MODALIDADES

[0158] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados no relatório descritivo acima são por meio deste incorporados a título de referência ao mesmo grau como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado a título de referência em sua totalidade.

[0159] Várias modificações e variações dos métodos, composições farmacêuticas e kits descritos da invenção estarão evidentes àqueles habilitados na técnica sem divergir do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em relação às modalidades específicas, será entendido que ela é capaz de outras modificações e que a invenção conforme reivindicada não deve ser indevidamente limitada a tais modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realizar a invenção que são óbvios àqueles habilitados na técnica são intencionadas a estar dentro do escopo da invenção. Este pedido é intencionado a abranger quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais desvios da presente divulgação, entram dentro da prática habitual conhecida dentro da técnica à qual a invenção pertence e podem ser aplicados às características essenciais aqui antes de apresentados.

MODALIDADES ESPECÍFICAS

[0160] As modalidades específicas a seguir também descrevem a presente invenção:

1. Método de tratar ou reduzir deposição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste, que compreende adminis-

trar um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3, ou uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo ao sujeito.

2. Método da modalidade 1, que a deposição de gordura anormal compreende deposição de gordura visceral.

3. Método da modalidade 2, que:

a) a deposição de gordura visceral anormal é associada com ou adjacente a um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestinos, órgãos reprodutivos e vesícula biliar;

b) a deposição de gordura visceral anormal causa doença em um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, pulmões, traqueia, fígado, pâncreas, cérebro, órgãos reprodutivos, artérias e vesícula biliar; ou

c) a deposição de gordura visceral anormal é causada por disfunção em um órgão endócrino, tal como uma glândula adrenal, uma glândula pituitária ou um órgão reprodutivo, tal como um ovário.

4. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 3, que o método reduz ou elimina uma ou mais condições associadas com a distribuição de gordura anormal.

5. Método, da modalidade 4, que uma ou mais condições são selecionadas do grupo consistindo em apneia obstrutiva do sono, doença pulmonar, doença cardiovascular, doença metabólica, doença neurológica, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, demência, infertilidade, irregularidades menstruais, desregulação de insulina e desregulação da glicose.

6. Método, da modalidade 5, que a dislipidemia compreende um nível anormal de um ou mais de triglicerídeos, lipoproteínas de

alta densidade (HDLs), lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e colesterol.

8. Método, da modalidade 5, que a doença cardiovascular é doença cardíaca ou acidente vascular cerebral.

9. Método, da modalidade 5, que a doença pulmonar é asma e doença pulmonar restritiva.

10. Método, da modalidade 5, que a doença neurológica é demência ou doença de Alzheimer.

11. Método, da modalidade 5, que a doença metabólica é diabete tipo 2, intolerância à glicose, esteatose hepática não alcoólica e toxicidade hepática.

12. Método, da modalidade 5, que a desregulação de insulina é resistência à insulina.

13. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 12, que o sujeito não está com sobrepeso ou carece de deposição de gordura subcutânea substancial.

14. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 13, que a deposição de gordura anormal é determinada usando uma técnica antropométrica ou imagiologia.

15. Método, da modalidade 14, que a técnica antropométrica é índice de massa corpórea (IMC) ou razão de gordura androide:ginoide.

16. Método, da modalidade 14, que a imagiologia compreende tomografia computadorizada (CT), imagiologia de ressonância magnética (MRI) e absorciometria de raio X de dupla energia (DXA).

18. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 18, que o paciente não exibe deposição de gordura anormal substancial fora do abdômen.

19. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 18, que o sujeito é um feto, um neonato, um infante, uma criança, um jovem,

um adolescente ou um adulto.

20. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 19, que o método reduz a deposição de gordura visceral.

21. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 20, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente.

22. Método, da modalidade 21, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 100 a 370 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular do polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente.

23. Método, da modalidade 21 ou 22, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 350 aminoácidos do domínio extracelular do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

24. Método, de qualquer uma das modalidades 21 a 23, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um domínio 1, 2 e/ou 3 do tipo C2 semelhante a Ig do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

25. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 24, que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um peptídeo de sinal e/ou um domínio de transmembrana, tal como o peptídeo de sinal e/ou domínio de transmembrana de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

26. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 25, que o polipeptídeo de sFGFR3 é um polipeptídeo maduro.

27. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 26, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 400 aminoácidos consecutivos ou menos de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

28. Método, da modalidade 27, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende entre 5 e 399 aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente, tal como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15 ou menos aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

29. Método, da modalidade 28, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 % ou 99 % de identidade de sequência aos aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

30. Método, da modalidade 29, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende os aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

31. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 30, que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio de tirosina cinase de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

32. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 31, que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

33. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 33, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150 ou 100 aminoácidos em comprimento.

34. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 33, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

35. Método, da modalidade 34, que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

36. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 35, que

o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

37. Método, da modalidade 36, que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

38. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 37, que o sujeito tem um transtorno de retardo do crescimento esquelético, obesidade, síndrome do ovário policístico ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

39. Método, da modalidade 38, que o transtorno de retardo do crescimento esquelético é uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

40. Método, da modalidade 39, que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose e camptodactilia, estatura alta e síndrome de perda auditiva (CAT-SHL).

41. Método, da modalidade 40, que o transtorno de retardo do crescimento esquelético é acondroplasia.

42. Método, da modalidade 40, que a craniossinostose é selecionada do grupo consistindo em síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon e síndrome Crouzonodermoesquelética.

43. Método, de qualquer uma das modalidades 38 a 42, que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é causada por expressão no paciente de uma variante de FGFR3 que exibe superativação dependente de ligante.

44. Método, da modalidade 43, que a variante de FGFR3

compreende uma substituição de aminoácido de um resíduo de glicina com um resíduo de arginina na posição 358 (G358R) como apresentado na SEQ ID NO: 9.

45. Método, de qualquer uma das modalidades 38 a 44, que o sujeito foi diagnosticado com o transtorno de retardo do crescimento esquelético, obesidade, síndrome do ovário policístico ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

46. Método, de qualquer uma das modalidades 38 a 45, que o sujeito exibe um ou mais sintomas do transtorno de retardo do crescimento esquelético selecionado do grupo consistindo em membros curtos, tronco curto, pernas tortas, uma marcha miopática, malformações cranianas, crânio em folha de trevo, craniossinostose, ossos vormianos, anomalias das mãos, anomalias dos pés, polegar do caroneiro e anomalias torácicas.

47. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 37, que o sujeito não tem um transtorno de retardo do crescimento esquelético, tal como uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

48. Método, da modalidade 47, que o sujeito não tem uma doença esquelética relacionada a FGFR3 é selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose e camptodactilia, estatura alta e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

49. Método, de qualquer uma das modalidades 21 a 25 e 27 a 32, que o polipeptídeo de FGFR3 humano que ocorre naturalmente compreende a sequência de aminoácido do Nº de Acesso no Genbank NP_000133.

50. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 49, que o polipeptídeo de sFGFR3 se liga a um fator de crescimento de fibro-

blasto (FGF).

51. Método, da modalidade 50, que o FGF é selecionado do grupo consistindo em fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF1), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), fator de crescimento de fibroblasto 9 (FGF9), fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18), fator de crescimento de fibroblasto 19 (FGF19), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23).

52. Método, da modalidade 50 ou 51, que a ligação é caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de 0,2 nM a cerca de 20 nM.

53. Método, da modalidade 52, que a ligação é caracterizada por uma K_d de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM, em que opcionalmente a K_d é cerca de 1 nm, cerca de 2 nm, cerca de 3 nm, cerca de 4 nm, cerca de 5 nm, cerca de 6 nm, cerca de 7 nm, cerca de 8 nm, cerca de 9 nm ou cerca de 10 nm.

54. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 53, que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 é apresentada na SEQ ID NO: 5.

55. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 54, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um peptídeo de sinal, tal como um peptídeo de sinal de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

56. Método, da modalidade 55, que o peptídeo de sinal compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

57. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 56, que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um polipeptídeo heterólogo.

58. Método, da modalidade 57, que o polipeptídeo heterólogo é uma região do fragmento cristalizável de uma imunoglobulina (região Fc) ou albumina sérica humana (HSA).

59. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 59, que o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 85 % e até 100 % de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

60. Polipeptídeo, da modalidade 59, que o polinucleotídeo consiste na sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

61. Método, da modalidade 59 ou 60, que o polinucleotídeo é um polinucleotídeo isolado.

62. Método, da modalidade 59 ou 60, que o polinucleotídeo está em um vetor.

63. Método, da modalidade 62, que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral e um vetor de fago.

64. Método, da modalidade 62 ou 63, que o vetor está na célula hospedeira.

65. Método, da modalidade 64, que a célula hospedeira é uma célula hospedeira isolada.

66. Método, da modalidade 65, que a célula hospedeira é do sujeito.

67. Método, da modalidade 66, que a célula hospedeira foi transformada com o polinucleotídeo.

68. Método, da modalidade 64 ou 65, que a célula hospedeira é uma célula HEK 293 ou célula CHO.

69. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 68, que o sFGFR3 é administrado como uma composição compreendendo um excipiente, portador ou diluente farmaceuticamente aceitável.

70. Método, da modalidade 69, que a composição é administrada ao sujeito em uma dose de cerca de 0,001 mg/kg a cerca de

30 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

71. Método, da modalidade 70, que a composição é administrada em uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

72. Método, de qualquer uma das modalidades 69 a 71, que a composição é administrada diariamente, semanalmente ou mensalmente.

73. Método, de qualquer uma das modalidades 69 a 72, que a composição é administrada sete vezes por semana, seis vezes por semana, cinco vezes por semana, quatro vezes por semana, três vezes por semana, duas vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas ou uma vez por mês.

74. Método, da modalidade 73, que a composição é administrada em uma dose de cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3 uma vez ou duas vezes por semana.

75. Método, de qualquer uma das modalidades 69 a 74, que a composição é administrada por administração parenteral, administração enteral ou administração tópica.

76. Método, da modalidade 75, que a composição é administrada por administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intra-arterial, administração intratecal ou administração intraperitoneal.

77. Método, da modalidade 76, que a composição é administrada por administração subcutânea.

78. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 77, que o sujeito não foi previamente administrado com o polipeptídeo de sFGFR3.

79. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 78, que o sujeito é um ser humano.

80. Método, de qualquer uma das modalidades 1 a 79, que

o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma meia-vida *in vivo* entre cerca de 2 horas a cerca de 25 horas.

81. Composição que compreende um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo para tratar ou reduzir distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste, tal como pelo método de qualquer uma das modalidades 1 a 80.

82. Uso de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 ou uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 na fabricação de um medicamento para tratar ou reduzir distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste, tal como pelo método de qualquer uma das modalidades 1 a 80.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratar ou reduzir deposição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3, ou uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo ao sujeito.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a deposição de gordura anormal compreende deposição de gordura visceral.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que:

a) a deposição de gordura visceral anormal é associada com ou adjacente a um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestinos, órgãos reprodutivos, e vesícula biliar;

b) a deposição de gordura visceral anormal causa doença em um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, pulmões, traqueia, fígado, pâncreas, cérebro, órgãos reprodutivos, artérias, e vesícula biliar; ou

c) a deposição de gordura visceral anormal é causada por disfunção em um órgão endógeno, tal como uma glândula adrenal, uma glândula pituitária, ou um órgão reprodutivo, tal como um ovário.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o método reduz ou elimina uma ou mais condições associadas com a distribuição de gordura anormal.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que uma ou mais condições são selecionadas do grupo consistindo em apneia obstrutiva do sono, doença pulmonar, doença cardiovascular, doença metabólica, doença neurológica, dislipidemia,

hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, demência, infertilidade, irregularidades menstruais, desregulação de insulina, e desregulação de glicose.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dislipidemia compreende um nível anormal de um ou mais de triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDLs), lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), e colesterol.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a doença cardiovascular é doença cardíaca ou acidente vascular cerebral.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a doença pulmonar é asma e doença pulmonar restritiva.

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a doença neurológica é demência ou doença de Alzheimer.

10. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a doença metabólica é diabete tipo 2, intolerância à glicose, esteatose hepática não alcoólica e toxicidade hepática.

11. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a desregulação de insulina é resistência à insulina.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o sujeito não está com sobrepeso ou carece de deposição de gordura subcutânea substancial.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a deposição de gordura anormal é determinada usando uma técnica antropométrica, ou imagiologia.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a técnica antropométrica é índice de massa corpó-

rea (BMI) ou razão de gordura androide:ginoide.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a imagiologia compreende tomografia computadorizada (CT), imagiologia de ressonância magnética (MRI), e absorciometria de raio X de dupla energia (DXA).

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o sujeito não exibe deposição de gordura anormal substancial fora do abdômen.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o sujeito é um feto, um neonato, um infante, uma criança, um jovem, um adolescente, ou um adulto.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o método reduz a deposição de gordura visceral.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 100 a 370 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 350 aminoácidos do domínio extracelular do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de

sFGFR3 compreende um domínio 1, 2, e/ou 3 do tipo C2 semelhante a Ig do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um peptídeo de sinal e/ou um domínio de transmembrana, tal como o peptídeo de sinal e/ou domínio de transmembrana de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 é um polipeptídeo maduro.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 400 aminoácidos consecutivos ou menos de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende entre 5 e 399 aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente, tal como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15, ou menos aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, ou 99 % de identidade de sequência aos aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende os aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3

carece de um domínio de tirosina cinase de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 75, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150, ou 100 aminoácidos em comprimento.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que o sujeito tem um transtorno

de retardo de crescimento esquelético, obesidade, síndrome do ovário policístico, ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o transtorno de retardo de crescimento esquelético é uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDM), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose, e camptodactilia, estatura alta, e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é acondroplasia.

40. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a craniossinostose é selecionada do grupo consistindo em síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, e síndrome Crouzonodermoesquelética.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 40, caracterizado pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é causada por expressão no sujeito de uma variante de FGFR3 que exibe superativação dependente de ligante.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a variante de FGFR3 compreende uma substituição de aminoácido de um resíduo de glicina com um resíduo de arginina na posição 358 (G358R) como apresentado na SEQ ID NO: 9.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizado pelo fato de que o sujeito foi diagnosticado com o transtorno de retardo de crescimento esquelético, obesidade,

síndrome do ovário policístico, ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 43, caracterizado pelo fato de que o sujeito exibe um ou mais sintomas do transtorno de retardo de crescimento esquelético selecionados do grupo consistindo em membros curtos, tronco curto, pernas tortas, uma marcha miopática, malformações cranianas, crânio em folha de trevo, craniossinostose, ossos vormianos, anomalias das mãos, anomalias dos pés, polegar do caroneiro, e anomalias torácicas.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que o sujeito não tem um transtorno de retardo de crescimento esquelético, tal como uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o sujeito não tem uma doença esquelética relacionada a FGFR3 é selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDII), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose, e camptodactilia, estatura alta, e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23 e 25 a 30, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de FGFR3 humano que ocorre naturalmente compreende a sequência de aminoácido do Nº de Acesso no Genbank NP_000133.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 se liga a um fator de crescimento de fibroblasto (FGF).

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o FGF é selecionado do grupo consistindo em fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF1), fator de crescimento de fi-

broblasto 2 (FGF2), fator de crescimento de fibroblasto 9 (FGF9), fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18), fator de crescimento de fibroblasto 19 (FGF19), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21), e fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23).

50. Método, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que a ligação é caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de 0,2 nM a cerca de 20 nM.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a ligação é caracterizada por uma K_d de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM, em que opcionalmente a Kd é cerca de 1 nm, cerca de 2 nm, cerca de 3 nm, cerca de 4 nm, cerca de 5 nm, cerca de 6 nm, cerca de 7 nm, cerca de 8 nm, cerca de 9 nm, ou cerca de 10 nm.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 é apresentada na SEQ ID NO: 5.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um peptídeo de sinal, tal como um peptídeo de sinal de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de sinal compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um polipeptídeo heterólogo.

56. Método, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo heterólogo é uma região do fragmento cristalizável de uma imunoglobulina (região Fc) ou albumina sé-

rica humana (HSA).

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 85 % e até 100 % de identidade de sequência à sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

58. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo consiste na sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

59. Método, de acordo com a reivindicação 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é um polinucleotídeo isolado.

60. Método, de acordo com a reivindicação 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está em um vetor.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral, e um vetor de fago.

62. Método, de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que o vetor está na célula hospedeira.

63. Método, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula hospedeira isolada.

64. Método, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é do sujeito.

65. Método, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira foi transformada com o polinucleotídeo.

66. Método, de acordo com a reivindicação 62 ou 63, carac-

terizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula HEK 293 ou célula CHO.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 66, caracterizado pelo fato de que o sFGFR3 é administrado como uma composição compreendendo um excipiente, portador, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada ao sujeito em uma dose de cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 30 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 69, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada diariamente, semanalmente ou mensalmente.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 70, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada sete vezes por semana, seis vezes por semana, cinco vezes por semana, quatro vezes por semana, três vezes por semana, duas vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas, ou uma vez por mês.

72. Método, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada em uma dose de cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3 uma vez ou duas vezes por semana.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 67 a 72, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por administração parenteral, administração enteral, ou administração tópica.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intra-arterial, administração intratecal, ou administração intraperitoneal.

75. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada por administração subcutânea.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 75, caracterizado pelo fato de que o sujeito não foi previamente administrado com o polipeptídeo de sFGFR3.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 76, caracterizado pelo fato de que o sujeito é um ser humano.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 77, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma meia-vida *in vivo* entre cerca de 2 horas a cerca de 25 horas.

79. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3, ou uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo para tratar ou reduzir distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste.

80. Composição, de acordo com a reivindicação 79, caracterizada pelo fato de que a deposição de gordura anormal compreende deposição de gordura visceral.

81. Composição, de acordo com a reivindicação 80, caracterizada pelo fato de que:

a) a deposição de gordura visceral é associada com ou adjacente a um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, fígado, baço, rins, pâncreas, intestinos, órgãos reprodutivos, e vesícula biliar;

b) a deposição de gordura visceral causa doença em um ou mais dos órgãos seguintes: o coração, pulmões, traqueia, fígado, pâncreas, cérebro, órgãos reprodutivos, artérias, e vesícula biliar; ou

c) a deposição de gordura visceral é causada por disfunção em um órgão endógeno, tal como uma glândula adrenal, uma glândula pituitária, ou um órgão reprodutivo, tal como um ovário.

82. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 81, caracterizada pelo fato de que a composição reduz ou elimina uma ou mais condições associadas com a distribuição de gordura anormal.

83. Composição, de acordo com a reivindicação 82, caracterizada pelo fato de que uma ou mais condições são selecionadas do grupo consistindo em apneia obstrutiva do sono, doença pulmonar, doença cardiovascular, doença metabólica, doença neurológica, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, demência, infertilidade, irregularidades menstruais, desregulação de insulina, e desregulação de glicose.

84. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a dislipidemia compreende um nível anormal de um ou mais de triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDLs), lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), e colesterol.

85. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a doença cardiovascular é doença cardíaca ou acidente vascular cerebral.

86. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a doença pulmonar é asma e doença pulmonar restritiva.

87. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a doença neurológica é demência ou doença de Alzheimer.

88. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a doença metabólica é diabete tipo 2, intolerância à glicose, esteatose hepática não alcoólica e toxicidade hepática.

89. Composição, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de que a desregulação de insulina é resistência à insulina.

90. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 89, caracterizada pelo fato de que o sujeito não está com sobrepeso ou carece de deposição de gordura subcutânea substancial.

91. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 90, caracterizada pelo fato de que a deposição de gordura anormal é determinada usando uma técnica antropométrica, ou imagiologia.

92. Composição, de acordo com a reivindicação 91, caracterizada pelo fato de que a técnica antropométrica é índice de massa corpórea (BMI) ou razão de gordura androide:ginoide.

93. Composição, de acordo com a reivindicação 91, caracterizada pelo fato de que a imagiologia compreende tomografia computadorizada (CT), imagiologia de ressonância magnética (MRI), e absorciometria de raio X de dupla energia (DXA).

94. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 93, caracterizada pelo fato de que o sujeito não exibe deposição de gordura anormal substancial fora do abdômen.

95. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 94, caracterizada pelo fato de que o sujeito é um feto, um neonato, um infante, uma criança, um jovem, um adolescente, ou um adulto.

96. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindi-

cações 79 a 95, caracterizada pelo fato de que a composição reduz deposição de gordura visceral.

97. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 96, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) que ocorre naturalmente.

98. Composição, de acordo com a reivindicação 97, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 100 a 370 aminoácidos consecutivos de um domínio extracelular do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

99. Composição, de acordo com a reivindicação 97 ou 98, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 350 aminoácidos do domínio extracelular do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

100. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 99, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um domínio 1, 2, e/ou 3 do tipo C2 semelhante a Ig do polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

101. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 100, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um peptídeo de sinal e/ou um domínio de transmembrana, tal como o peptídeo de sinal e/ou domínio de transmembrana de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

102. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 101, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 é um polipeptídeo maduro.

103. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 102, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende 400 aminoácidos consecutivos ou menos de um

domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

104. Composição, de acordo com a reivindicação 103, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende entre 5 e 399 aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente, tal como 175, 150, 125, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15, ou menos aminoácidos consecutivos do domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

105. Composição, de acordo com a reivindicação 104, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, ou 99 % de identidade de sequência aos aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

106. Composição, de acordo com a reivindicação 105, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende os aminoácidos 401 a 413 da SEQ ID NO: 8.

107. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 106, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio de tirosina cinase de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

108. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 107, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 carece de um domínio intracelular de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

109. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 108, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende menos do que 475, 450, 425, 400, 375, 350, 300, 250, 200, 150, ou 100 aminoácidos em comprimento.

110. Composição, de acordo com qualquer uma das reivin-

dicações 79 a 109, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

111. Composição, de acordo com a reivindicação 110, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência aos resíduos de aminoácidos 1 a 280 da SEQ ID NO: 8.

112. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 111, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85 % de identidade de sequência à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

113. Composição, de acordo com a reivindicação 112, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 tem 86 % a 100 % de identidade de sequência à sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7.

114. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 113, caracterizada pelo fato de que o sujeito tem um transtorno de retardo de crescimento esquelético, obesidade, síndrome do ovário policístico, ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

115. Composição, de acordo com a reivindicação 114, caracterizada pelo fato de que o transtorno de retardo de crescimento esquelético é uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

116. Composição, de acordo com a reivindicação 115, caracterizada pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDM), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans

(SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose, e camptodactilia, estatura alta, e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

117. Composição, de acordo com a reivindicação 116, caracterizada pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é acondroplasia.

118. Composição, de acordo com a reivindicação 116, caracterizada pelo fato de que a craniossinostose é selecionada do grupo consistindo em síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, e síndrome Crouzonodermoesquelética.

119. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 115 a 118, caracterizada pelo fato de que a doença esquelética relacionada a FGFR3 é causada por expressão no sujeito de uma variante de FGFR3 que exibe superativação dependente de ligante.

120. Composição, de acordo com a reivindicação 119, caracterizada pelo fato de que a variante de FGFR3 compreende uma substituição de aminoácido de um resíduo de glicina com um resíduo de arginina na posição 358 (G358R) como apresentado na SEQ ID NO: 9.

121. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 114 a 120, caracterizada pelo fato de que o sujeito foi diagnosticado com o transtorno de retardo de crescimento esquelético, obesidade, síndrome do ovário policístico, ou hipercortisolismo, tal como doença de Cushing.

122. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 114 a 121, caracterizada pelo fato de que o sujeito exibe um ou mais sintomas do transtorno de retardo de crescimento esquelético selecionados do grupo consistindo em membros curtos, tronco curto, pernas tortas, uma marcha miopática, malformações cranianas, crânio em folha de trevo, craniossinostose, ossos vormianos, anomalias das mãos, anomalias dos pés, polegar do caroneiro, e anomalias torácicas.

123. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 113, caracterizada pelo fato de que o sujeito não tem um transtorno de retardo de crescimento esquelético, tal como uma doença esquelética relacionada a FGFR3.

124. Composição, de acordo com a reivindicação 123, caracterizada pelo fato de que o sujeito não tem uma doença esquelética relacionada a FGFR3 selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I (TDI), displasia tanatofórica tipo II (TDM), acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans (SADDEN), hipocondroplasia, uma craniossinostose, e camptodactilia, estatura alta, e síndrome de perda auditiva (CATSHL).

125. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 101 e 103 a 108, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de FGFR3 humano que ocorre naturalmente compreende a sequência de aminoácido do Nº de Acesso no Genbank NP_000133.

126. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 125, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 se liga a um fator de crescimento de fibroblasto (FGF).

127. Composição, de acordo com a reivindicação 126, caracterizada pelo fato de que o FGF é selecionado do grupo consistindo em fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF1), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), fator de crescimento de fibroblasto 9 (FGF9), fator de crescimento de fibroblasto 10 (FGF10), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18), fator de crescimento de fibroblasto 19 (FGF19), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21), e fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23).

128. Composição, de acordo com a reivindicação 126 ou 127, caracterizada pelo fato de que a ligação é caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio (K_d) de cerca de 0,2 nM a cerca de 20 nM.

129. Composição, de acordo com a reivindicação 128, caracterizada pelo fato de que a ligação é caracterizada por uma K_d de cerca de 1 nM a cerca de 10 nM, em que opcionalmente a K_d é cerca de 1 nm, cerca de 2 nm, cerca de 3 nm, cerca de 4 nm, cerca de 5 nm, cerca de 6 nm, cerca de 7 nm, cerca de 8 nm, cerca de 9 nm, ou cerca de 10 nm.

130. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 129, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácido do polipeptídeo de sFGFR3 é apresentada na SEQ ID NO: 5.

131. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 130, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um peptídeo de sinal, tal como um peptídeo de sinal de um polipeptídeo de FGFR3 que ocorre naturalmente.

132. Composição, de acordo com a reivindicação 131, caracterizada pelo fato de que o peptídeo de sinal compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 21.

133. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 132, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 compreende um polipeptídeo heterólogo.

134. Composição, de acordo com a reivindicação 133, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo heterólogo é uma região do fragmento cristalizável de uma imunoglobulina (região Fc) ou albumina sérica humana (HSA).

135. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 134, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 compreende uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos 85 % e até 100 % de identidade de sequência a sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

136. Composição, de acordo com a reivindicação 135, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo consiste na sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID NOs: 10 a 18.

137. Composição, de acordo com a reivindicação 135 ou 136, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo é um polinucleotídeo isolado.

138. Composição, de acordo com a reivindicação 135 ou 136, caracterizada pelo fato de que o polinucleotídeo está em um vetor.

139. Composição, de acordo com a reivindicação 138, caracterizada pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cromossomo artificial, um vetor viral, e um vetor de fago.

140. Composição, de acordo com a reivindicação 138 ou 139, caracterizada pelo fato de que o vetor está na célula hospedeira.

141. Composição, de acordo com a reivindicação 140, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula hospedeira isolada.

142. Composição, de acordo com a reivindicação 141, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é do sujeito.

143. Composição, de acordo com a reivindicação 142, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira foi transformada com o polinucleotídeo.

144. Composição, de acordo com a reivindicação 140 ou 141, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula HEK 293 ou célula CHO.

145. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 144, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um excipiente, portador, ou diluente farmaceuticamente aceitável.

146. Composição, de acordo com a reivindicação 145, ca-

racterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito em uma dose de cerca de 0,001 mg/kg a cerca de 30 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

147. Composição, de acordo com a reivindicação 146, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito em uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3.

148. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 147, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito diariamente, semanalmente ou mensalmente.

149. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 148, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito sete vezes por semana, seis vezes por semana, cinco vezes por semana, quatro vezes por semana, três vezes por semana, duas vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas, ou uma vez por mês.

150. Composição, de acordo com a reivindicação 149, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito em uma dose de cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do polipeptídeo de sFGFR3 uma vez ou duas vezes por semana.

151. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 145 a 150, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito por administração parenteral, administração enteral, ou administração tópica.

152. Composição, de acordo com a reivindicação 151, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito por administração subcutânea, administração intravenosa, administração intramuscular, administração intra-arterial, ad-

ministração intratecal, ou administração intraperitoneal.

153. Composição, de acordo com a reivindicação 152, caracterizada pelo fato de que a composição é formulada para administração ao sujeito por administração subcutânea.

154. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 153, caracterizada pelo fato de que o sujeito não foi previamente administrado com o polipeptídeo de sFGFR3.

155. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 154, caracterizada pelo fato de que o sujeito é um ser humano.

156. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 79 a 155, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de sFGFR3 tem uma meia-vida *in vivo* entre cerca de 2 horas a cerca de 25 horas.

157. Uso, caracterizado pelo fato de ser de um polipeptídeo de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto solúvel (sFGFR3), um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3, ou uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de sFGFR3 na fabricação de um medicamento para tratar ou reduzir distribuição de gordura anormal em um sujeito em necessidade deste, tal como pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 78.

FIG. 1A

Idade (anos)	[0-3]		[4-8]		[9-18]		p	
Variáveis	Média ± SD	Faixa (min-max)	Média ± SD	Faixa (min-max)	Média ± SD	Faixa (min-max)		
Peso (kg)	7.30 ± 2.56	(2.50-13.10)	16.95 ± 3.35	(11.40-29.10)	43.93 ± 10.33	(26.00-63.40)	< 0.0001	a, b, c
Altura (cm)	63.17 ± 9.34	(44.00-82.00)	91.41 ± 5.50	(77.00-106.10)	118.50 ± 5.74	(104.50-126.50)	0.001	b, c
score z de altura-para-idade (média)	-3.07 SD		-4.29 SD		-5.85 SD			
BMI (kg/m^2)	17.64 ± 2.05	(12.68-21.21)	20.10 ± 1.95	(14.18-25.85)	30.85 ± 4.87	(23.81-39.62)	0.001	b, c
score z de BMI-para-idade (média)	+1.70 SD		+3.54 SD		+2.71 SD			

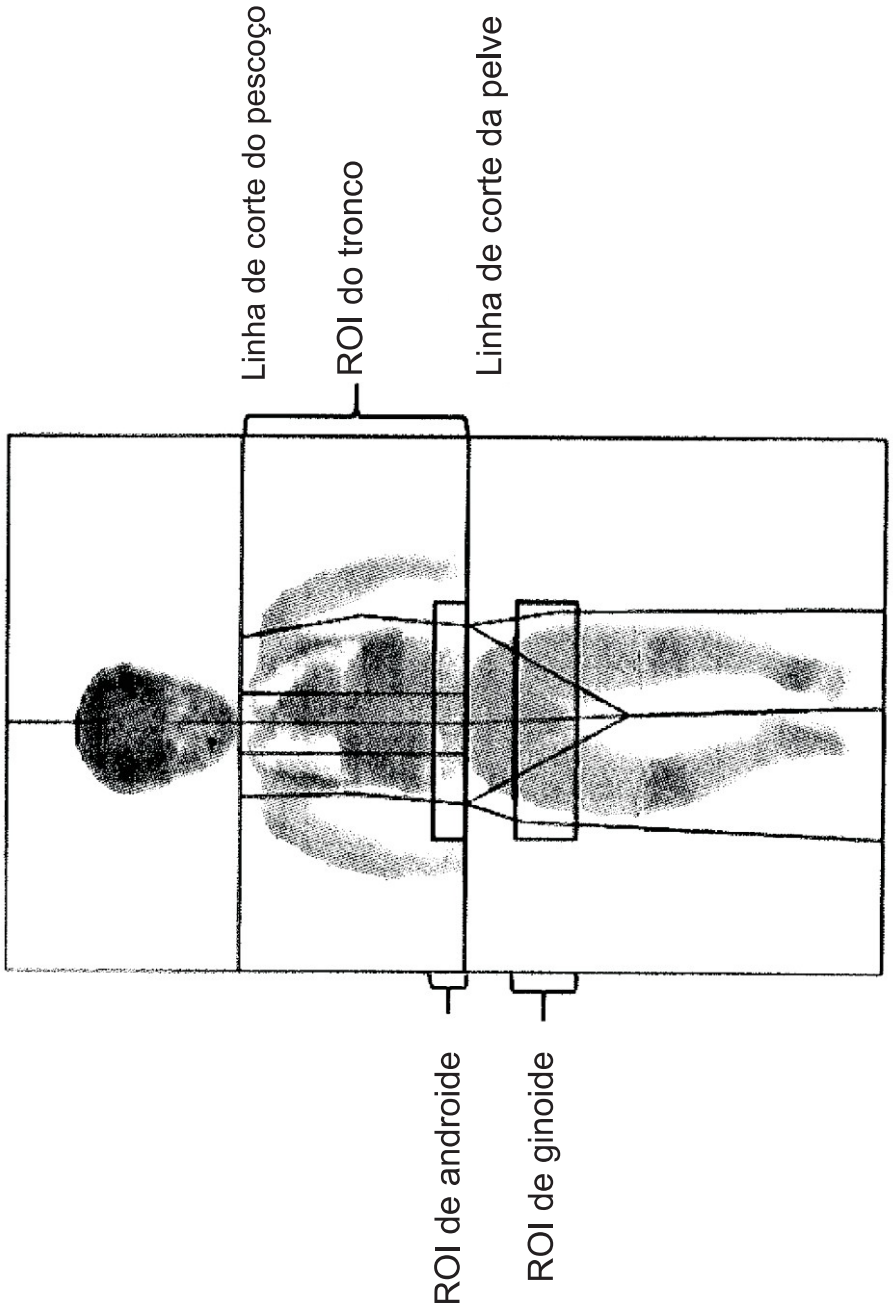

Linha de corte do pescoço
ROI do tronco
Linha de corte da pelve
ROI de androide
ROI de ginoide

FIG. 1B

FIG. 1C

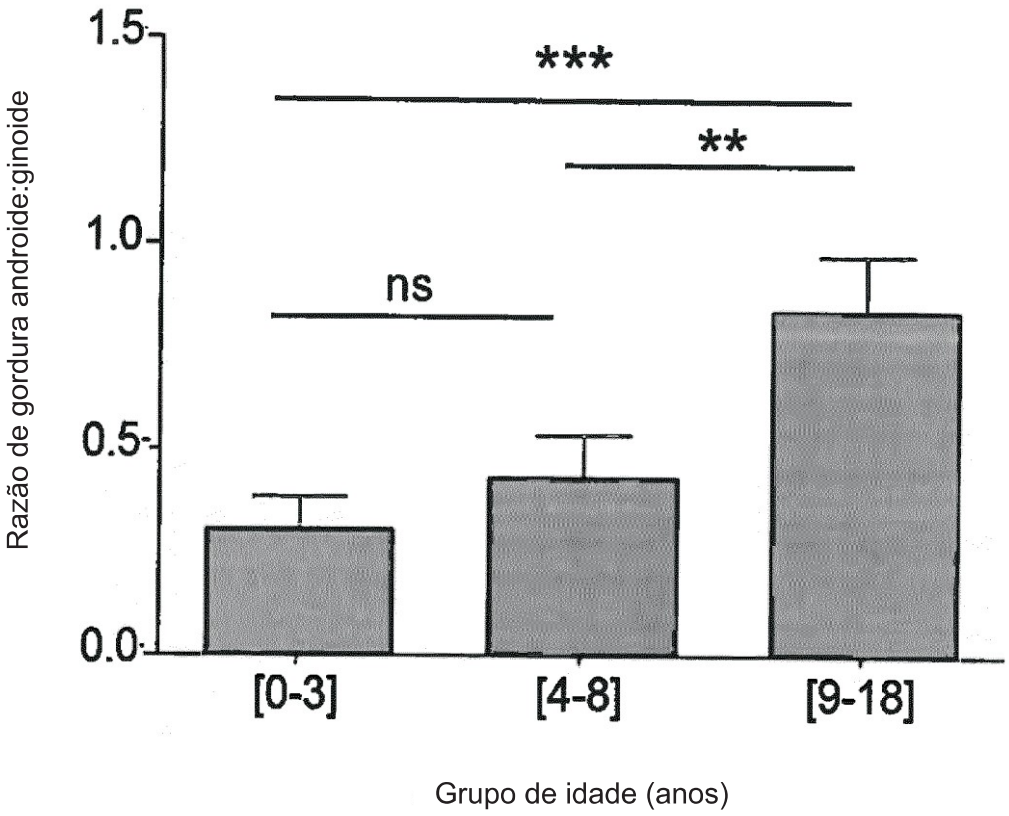

1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
ns
[0-3]
[4-8]
[9-18]
Razão de gordura androide:ginoide
Grupo de idade (anos)

FIG. 1D

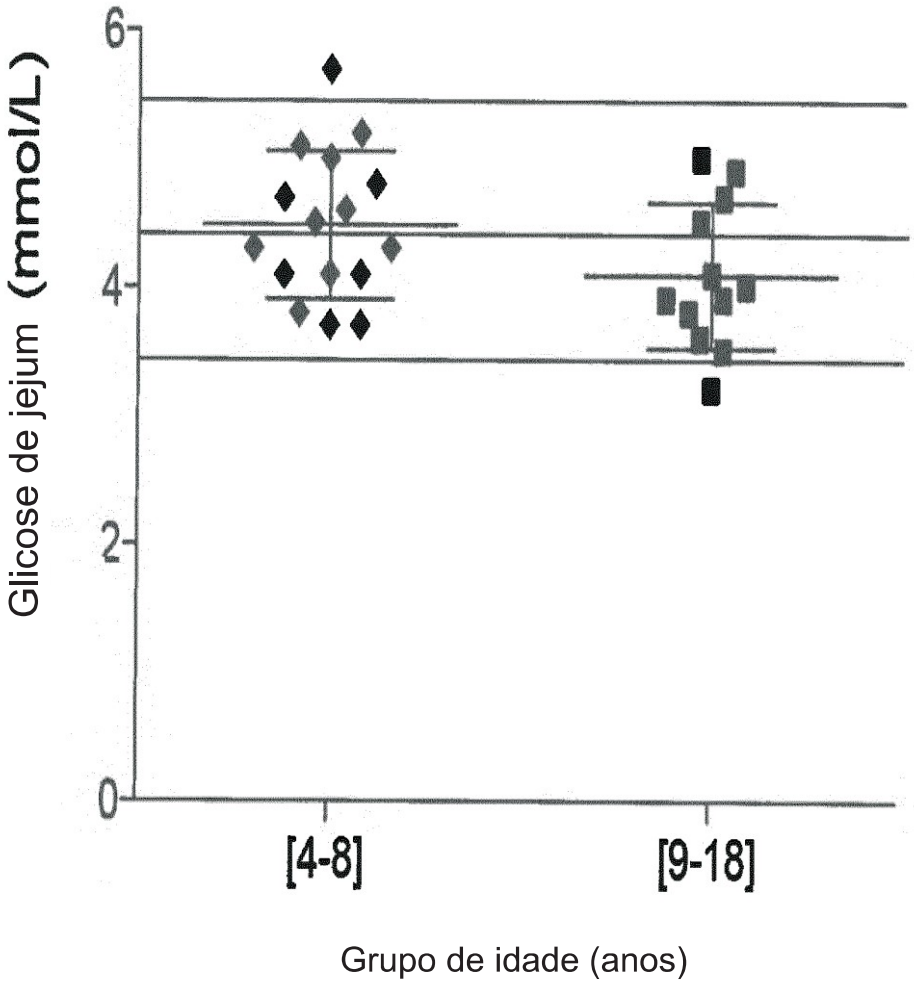


FIG. 2A

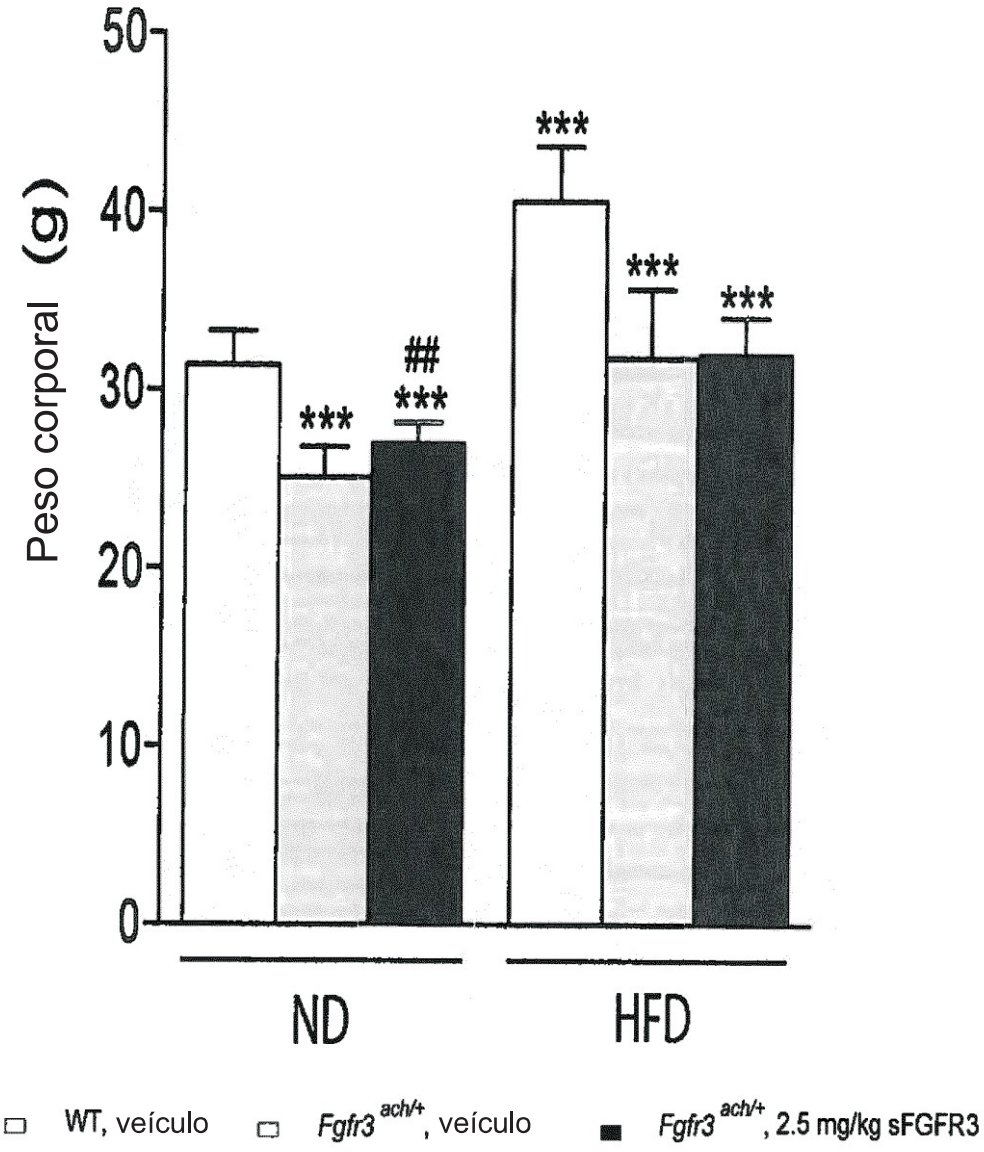

Peso corporal (g)
50
40
30
20
10
0
***
***
##
***
***
***
ND
HFD
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2B

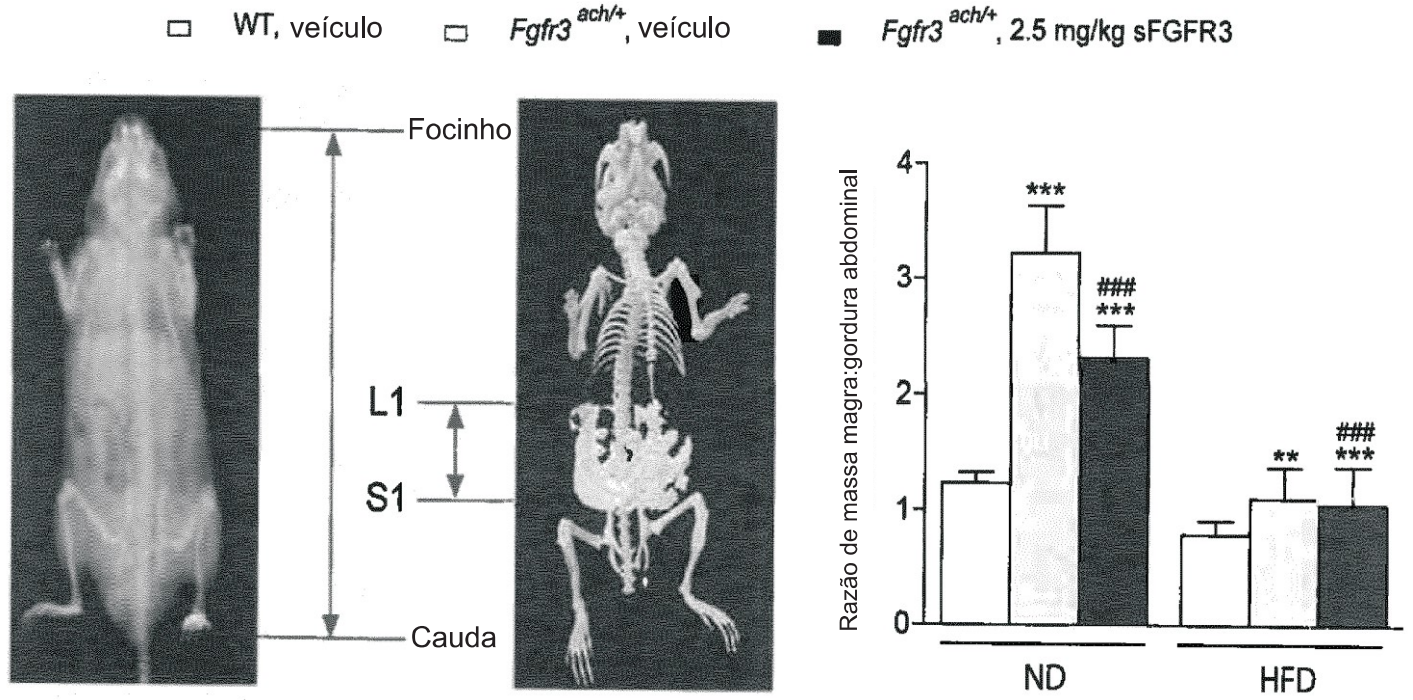

WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3
Focinho
L1
S1
Cauda
Razão de massa magra:gordura abdominal
0
1
2
3
4
***
###
***
**
###
***
ND
HFD

FIG. 2C

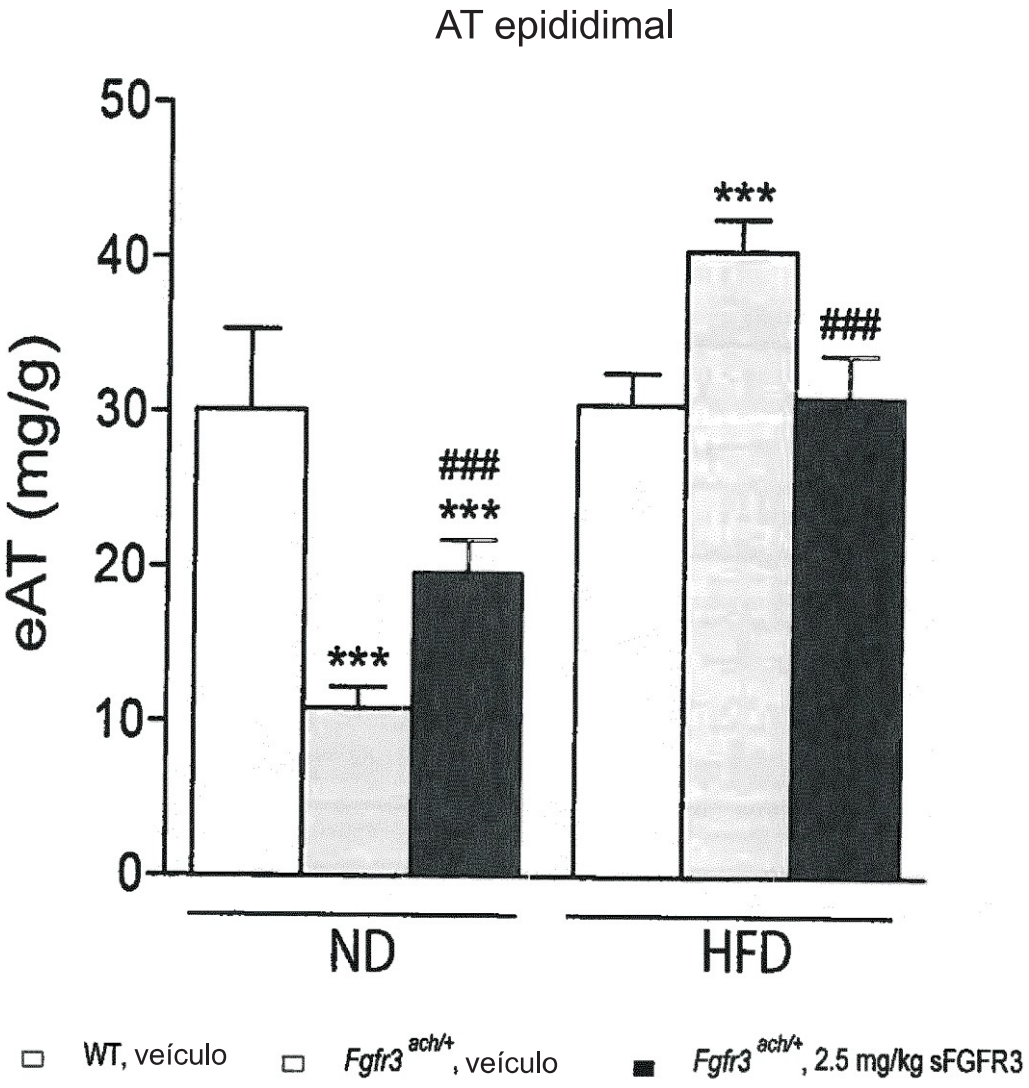

AT epididimal
eAT (mg/g)
50
40
30
20
10
0
***
***
###
***
###
ND
HFD
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2D

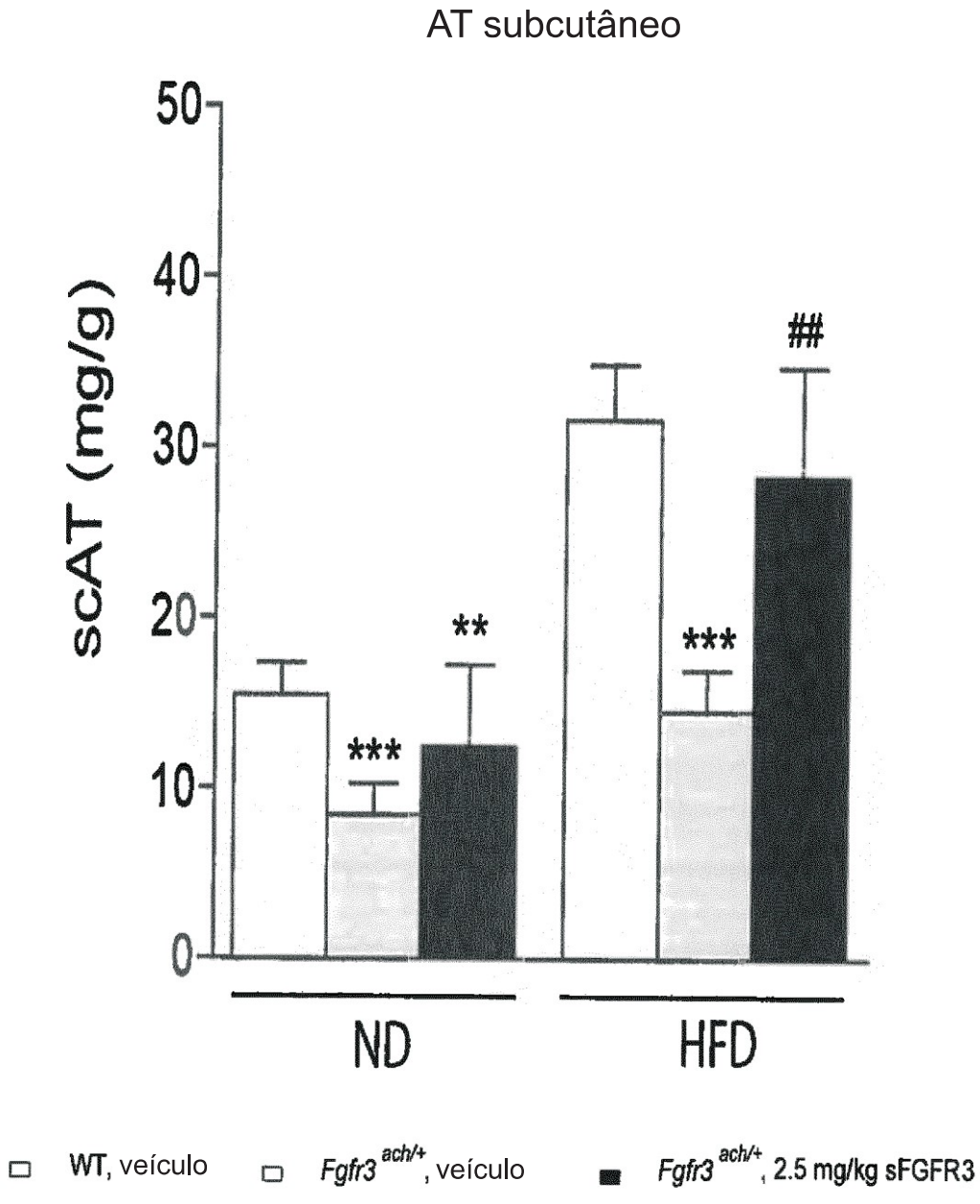

AT subcutâneo
scAT (mg/g)
50
40
30
20
10
0
**
***
***
##
ND
HFD
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2E

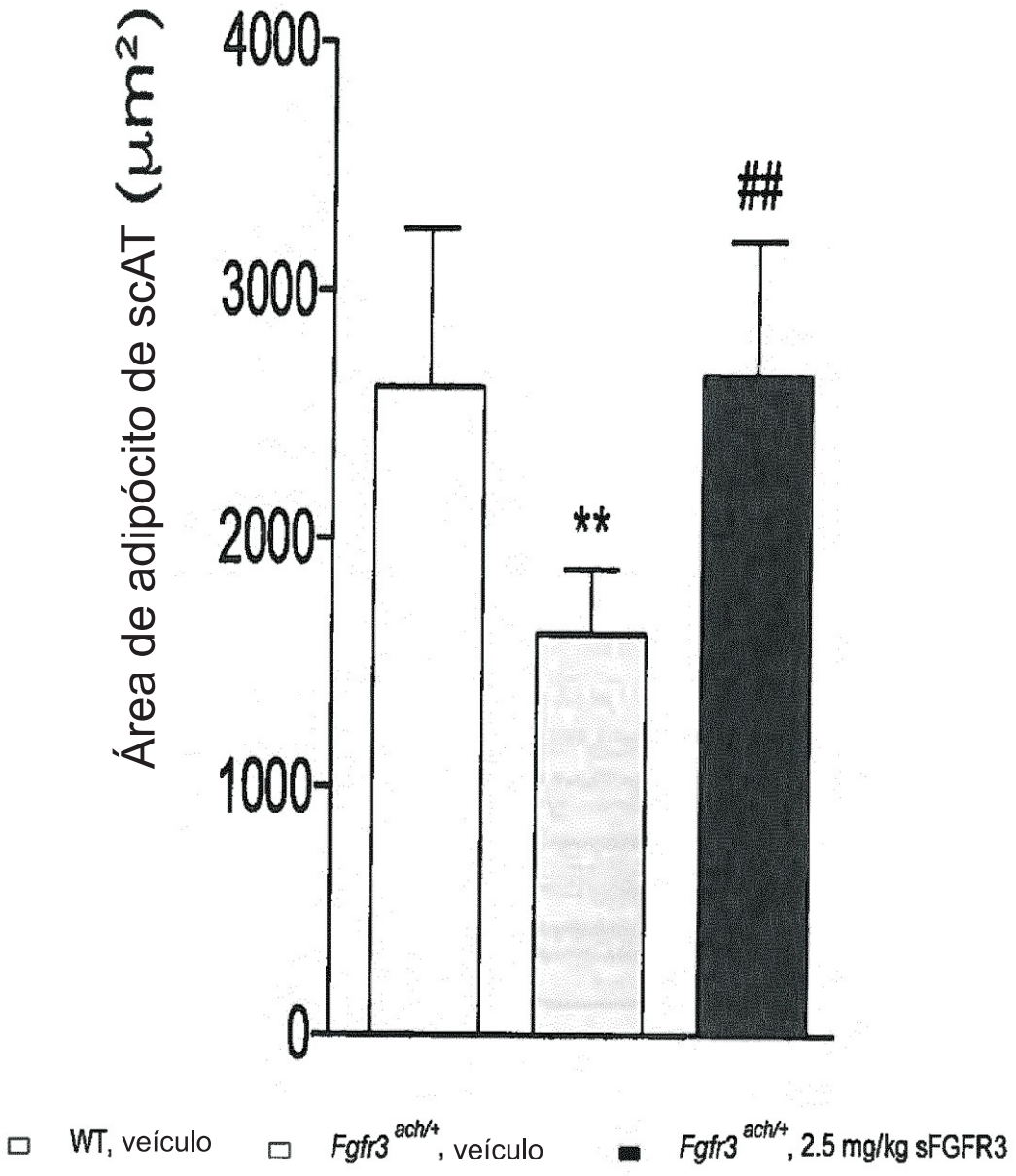
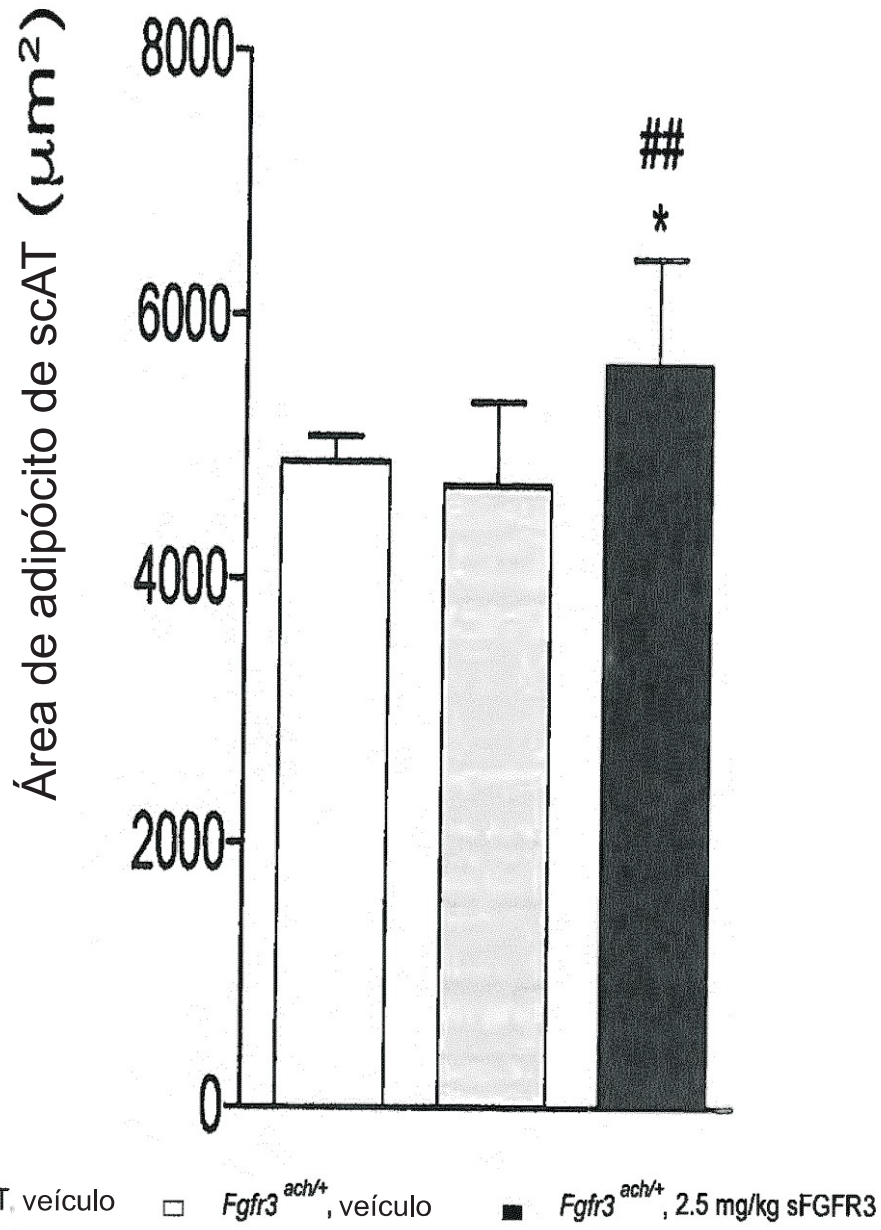

Área de adipócito de scAT (µm²)
4000
3000
2000
1000
0
**
##
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2F


Área de adipócito de scAT (µm²)
8000
6000
4000
2000
0
##
*
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

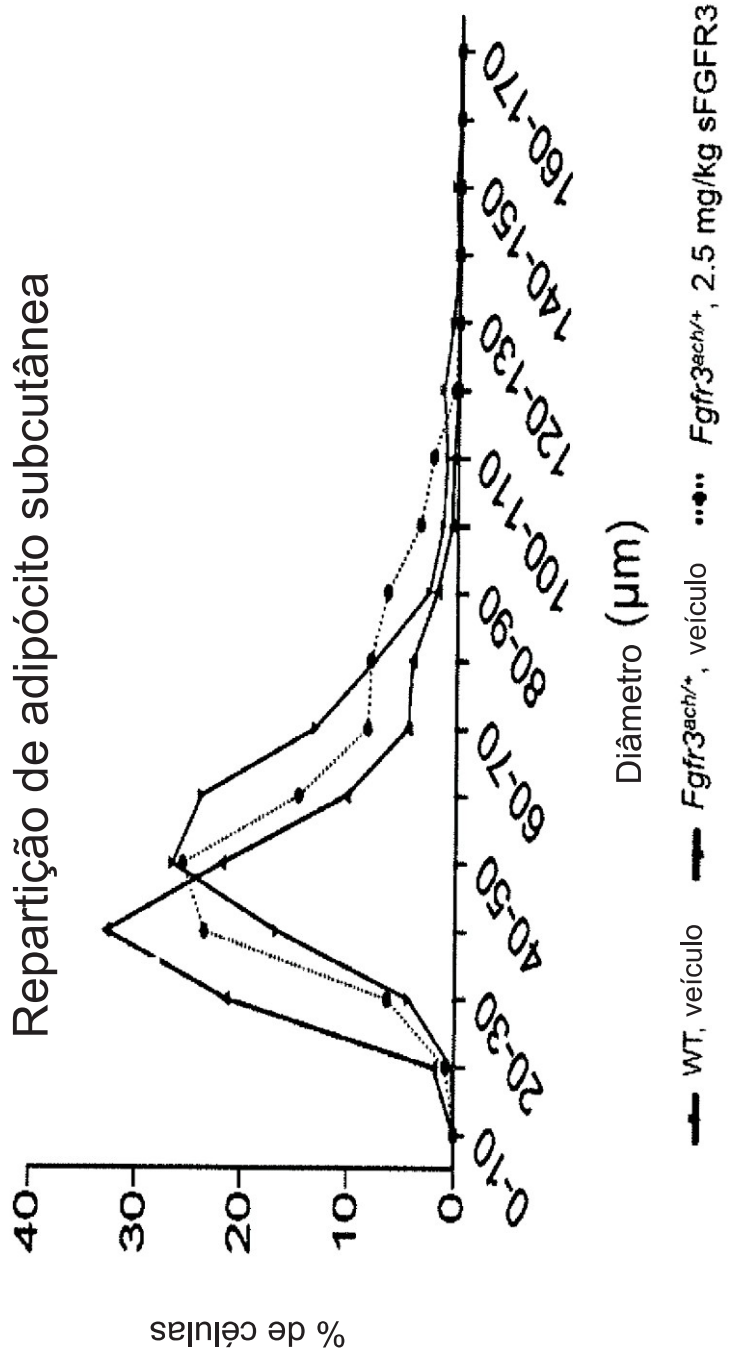

Repartição de adipócito subcutânea
% de células
40
30
20
10
0
0-10
20-30
40-50
60-70
80-90
100-110
120-130
140-150
160-170
Diâmetro (µm)
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2G

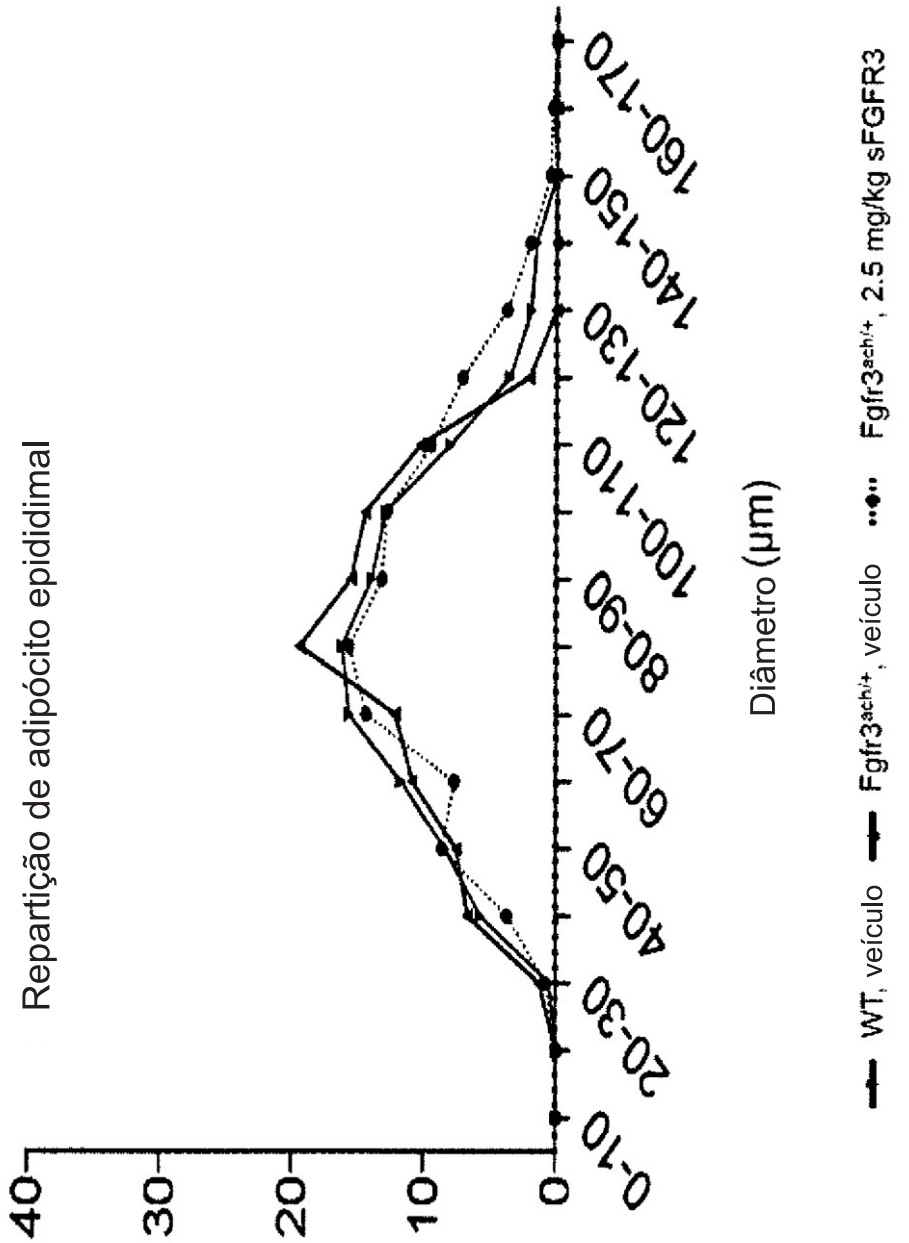

Repartição de adipócito epididimal
% de células
40
30
20
10
0
0-10
20-30
40-50
60-70
80-90
100-110
120-130
140-150
160-170
Diâmetro (µm)
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 2H

FIG. 3A

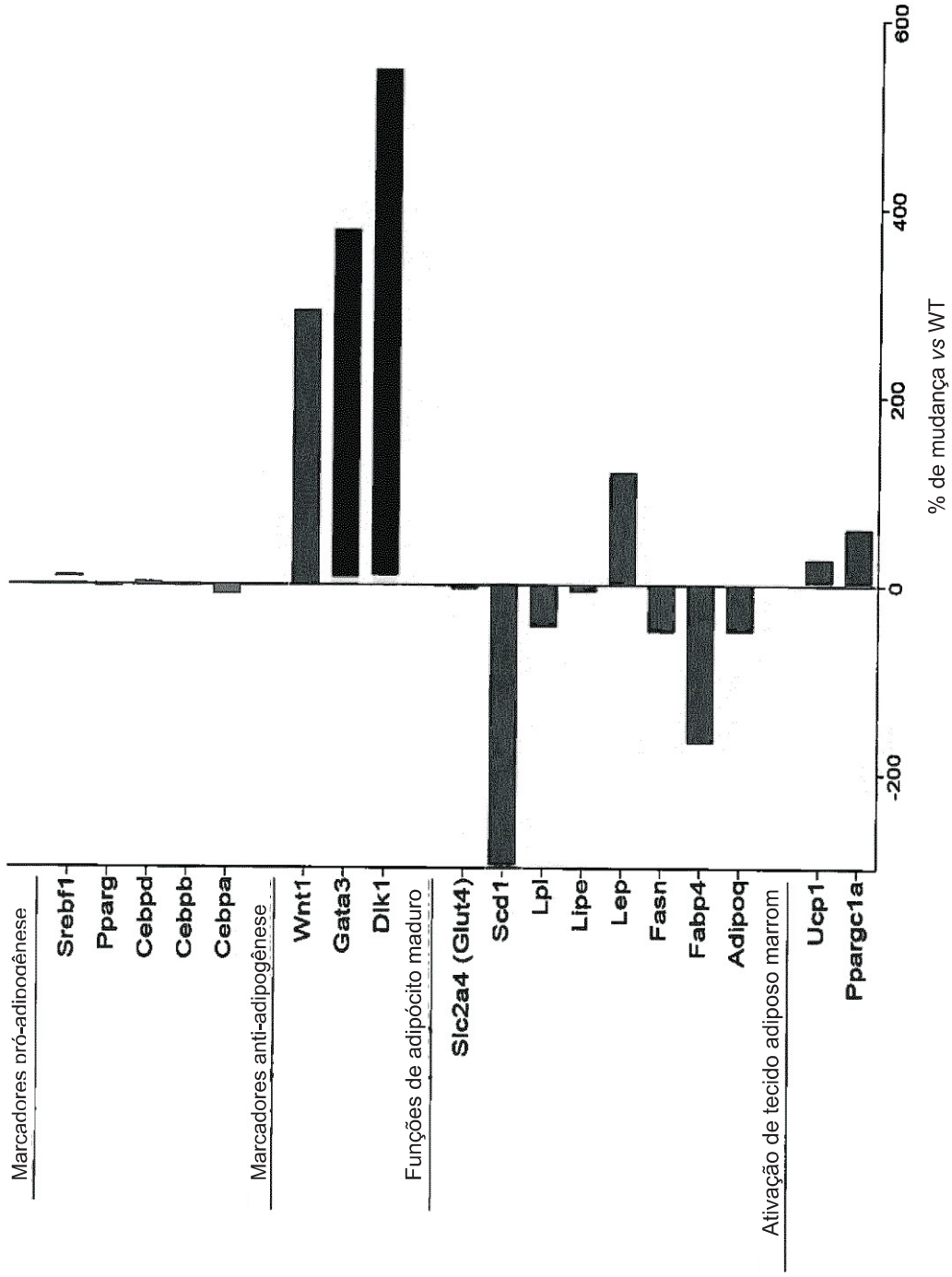

Marcadores pró-adipogênese
Srebf1
Pparg
Cebpd
Cebpb
Cebpa
Marcadores anti-adipogênese
Wnt1
Gata3
Dlk1
Funções de adipócito maduro
Slc2a4 (Glut4)
Scd1
Lpl
Lipe
Lep
Fasn
Fabp4
Adipoq
Ativação de tecido adiposo marrom
Ucp1
Ppargc1a
-200
0
200
400
600
% de mudança vs WT

FIG. 3B

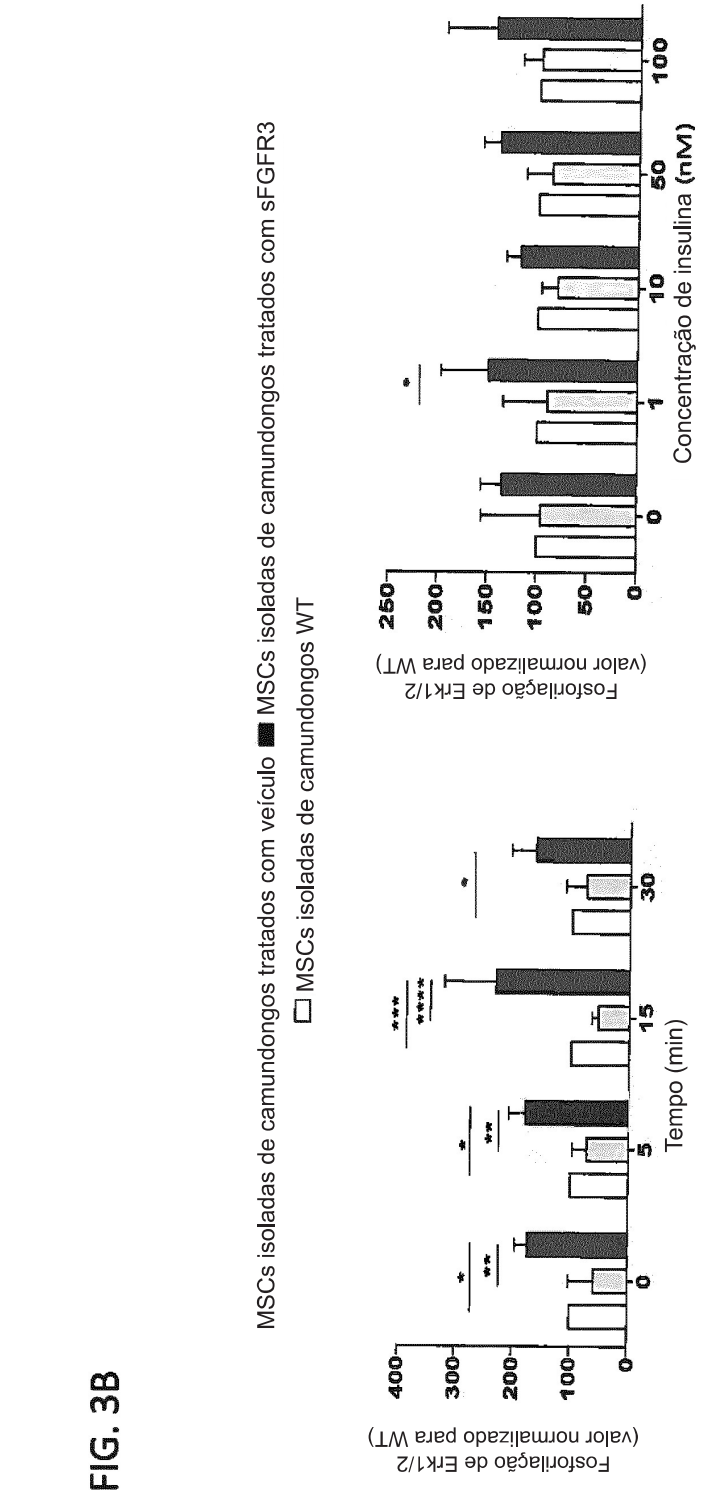

MSCs isoladas de camundongos tratados com veículo ■ MSCs isoladas de camundongos tratados com sFGFR3
□ MSCs isoladas de camundongos WT
Fosforilação de Erk1/2
(valor normalizado para WT)
Tempo (min)
Concentração de insulina (nM)

FIG. 4A

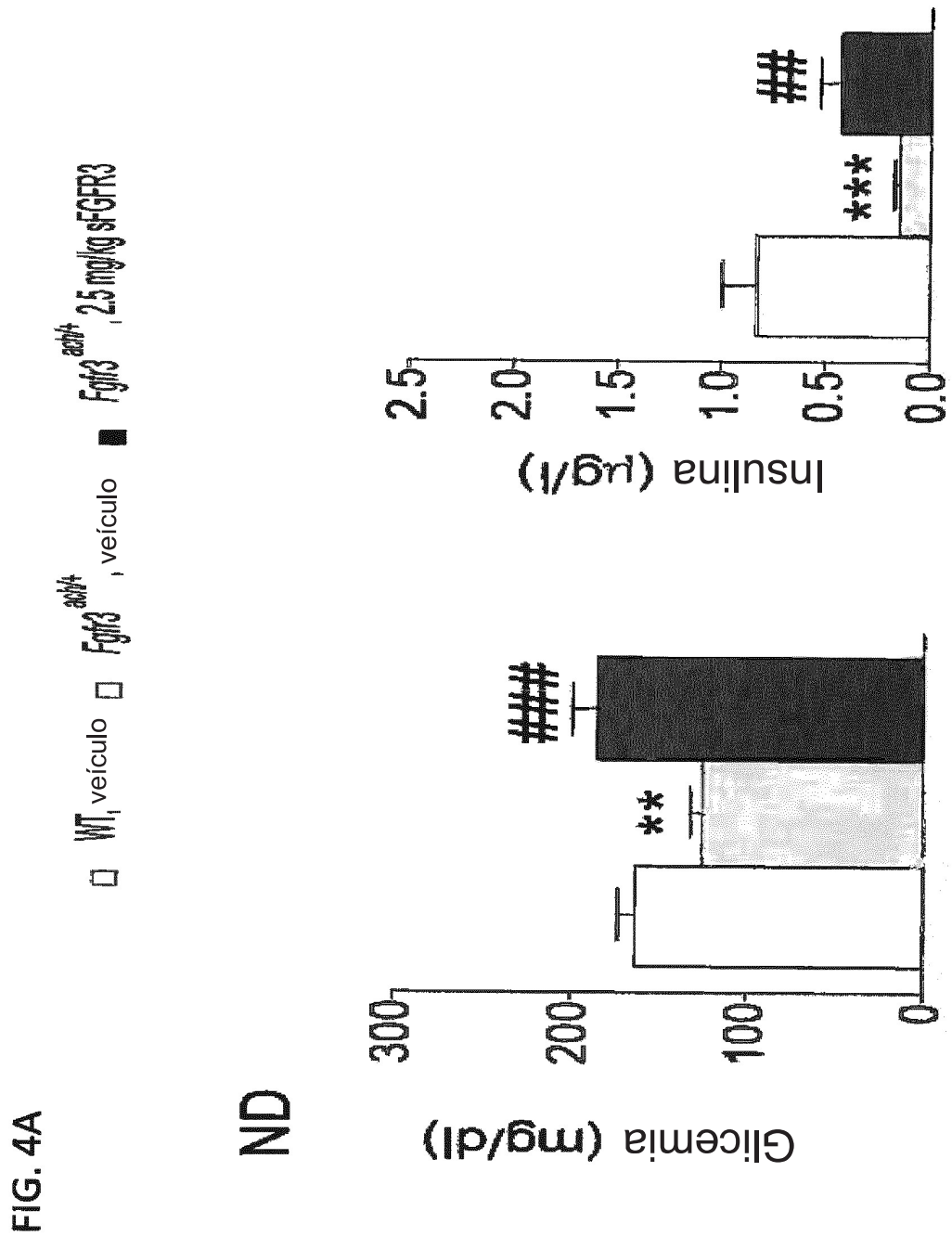

□ WT, veículo □ Fgfr3 ach/+, veículo ■ Fgfr3 ach/+, 2,5 mg/kg sFGFR3
ND
Glicemia (mg/dl)
300
200
100
0
**
####
Insulina (µg/l)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
###

FIG. 4B

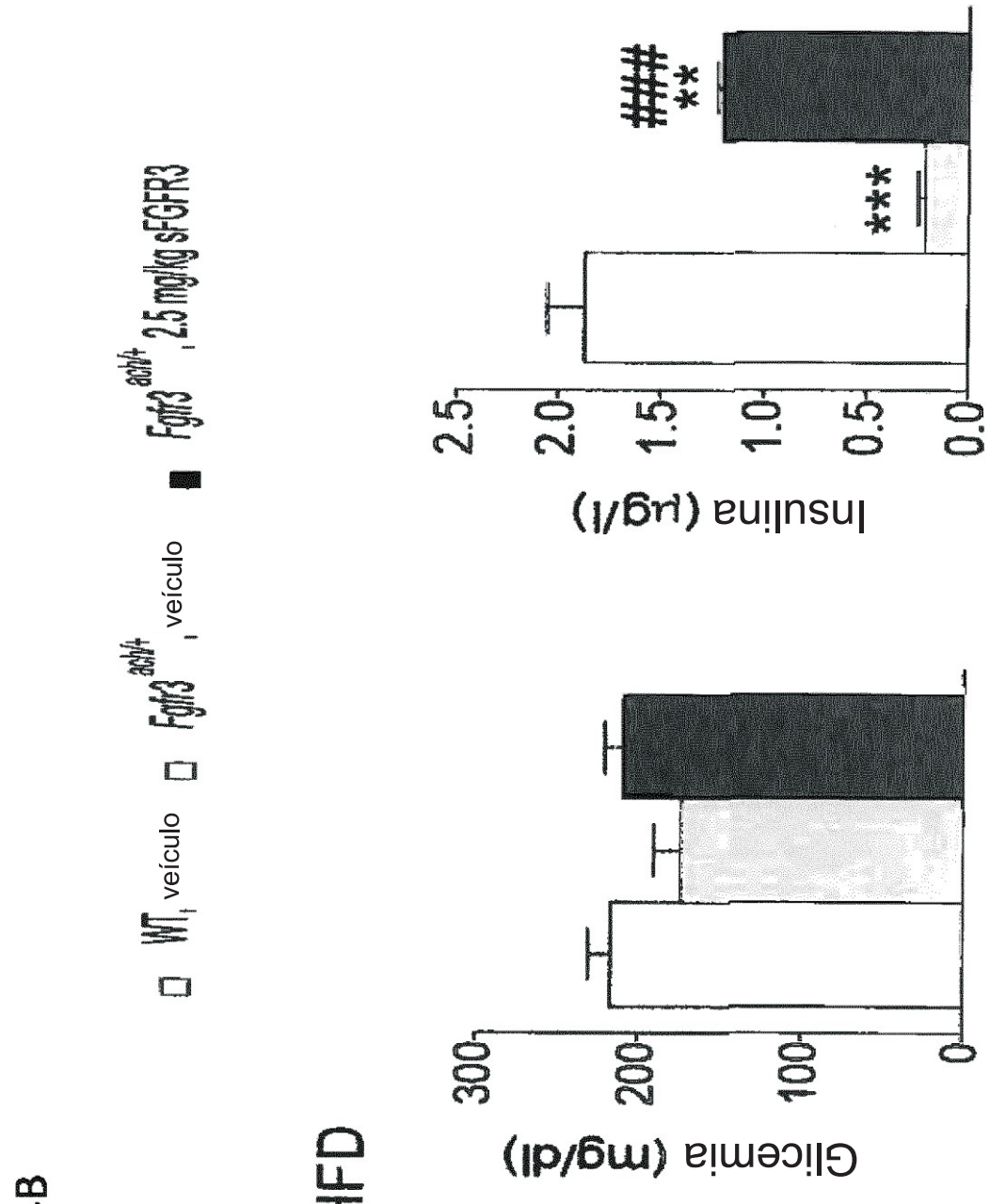

WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2,5 mg/kg sFGFR3
HFD
Glicemia (mg/dl)
300
200
100
0
Insulina (µg/l)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
###

FIG. 4C

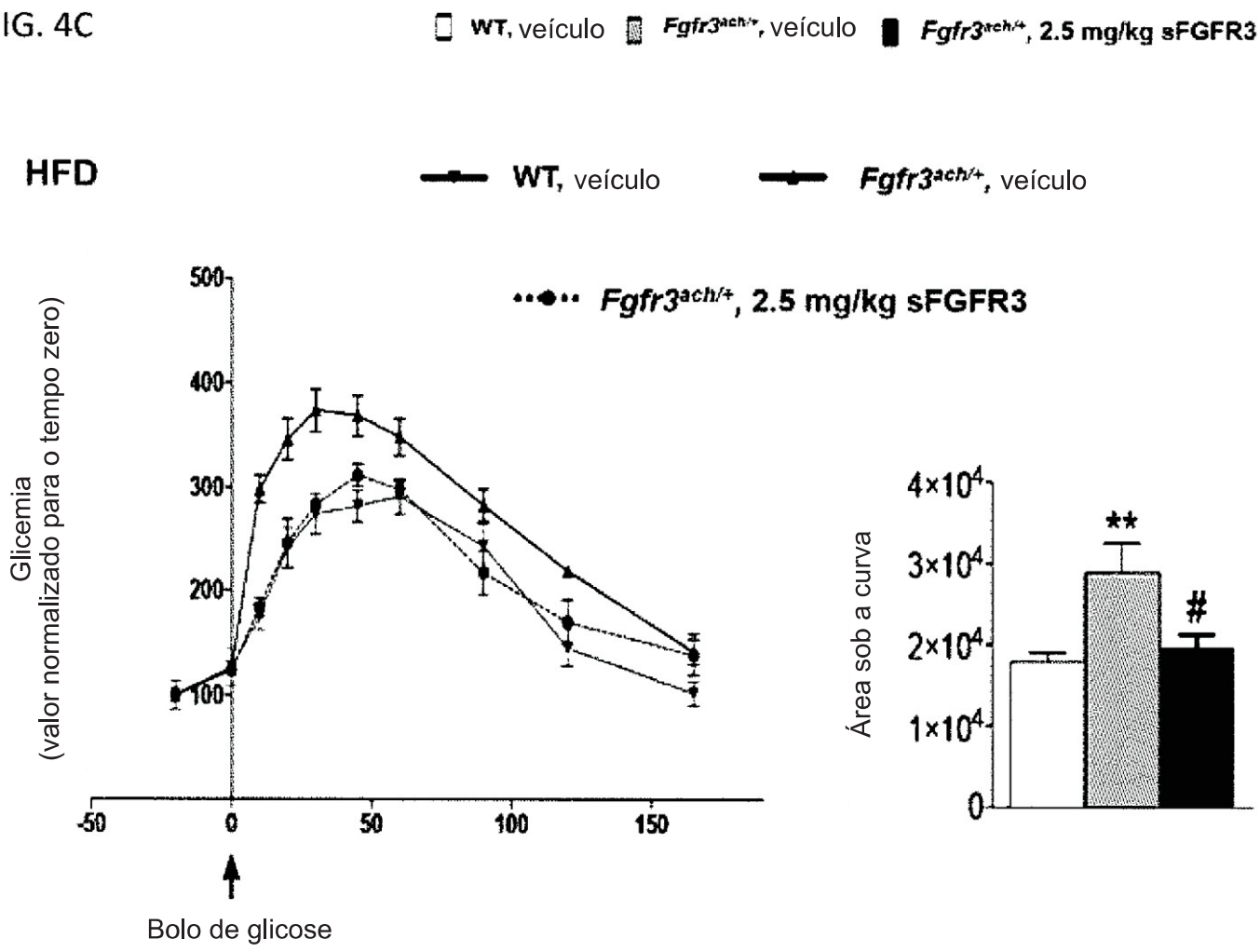

WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3
HFD
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3
Glicemia
(valor normalizado para o tempo zero)
500
400
300
200
100
-50
0
50
100
150
Bolo de glicose
Área sob a curva
4×10^4
3×10^4
2×10^4
1×10^4
0
**
#

FIG. 4D

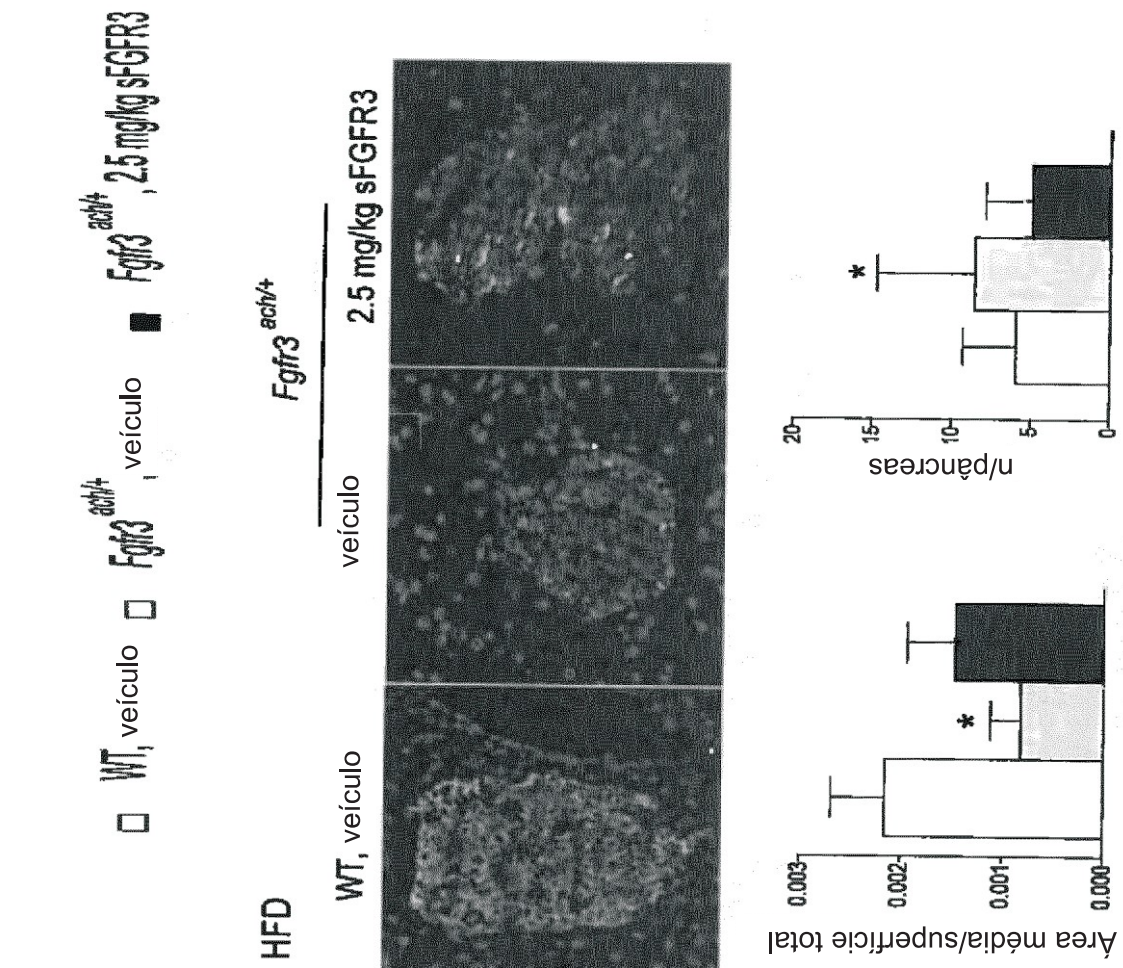
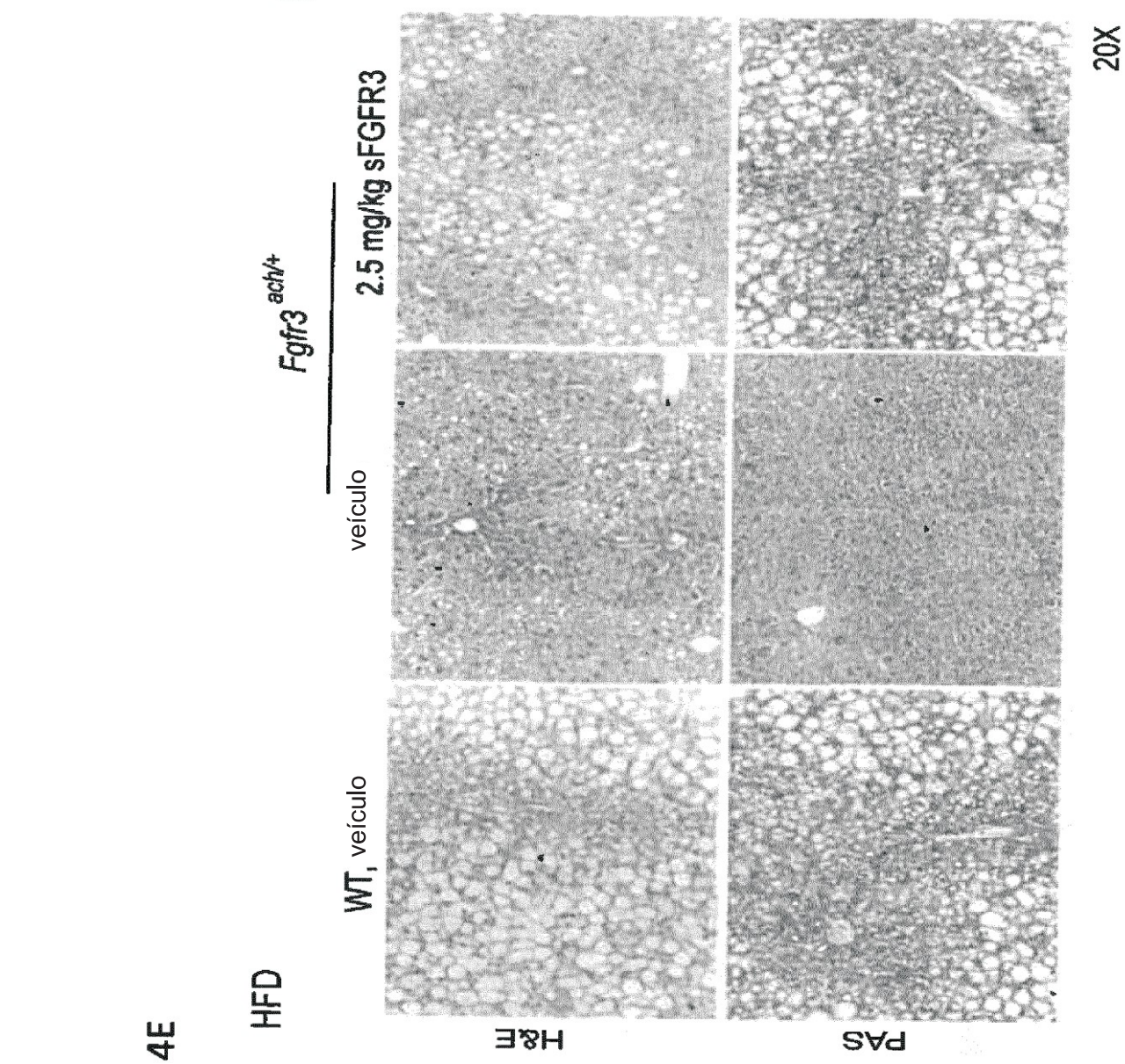

WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2,5 mg/kg sFGFR3
HFD
WT, veículo
Fgfr3 ach/+
veículo
2.5 mg/kg sFGFR3
Área média/superfície total
0.003
0.002
0.001
0.000
*
n/pâncreas
20
15
10
5
0
*

FIG. 4E



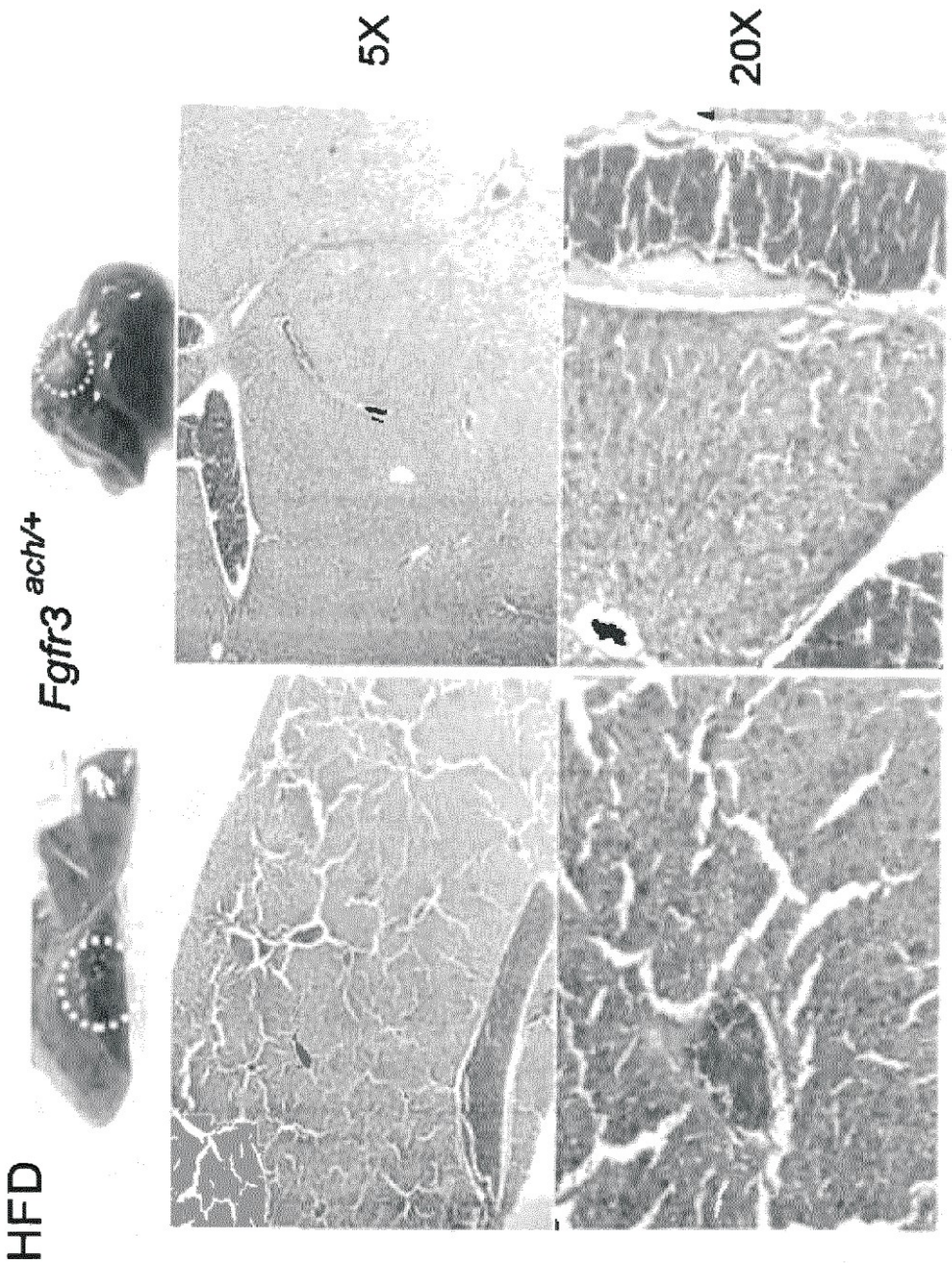


FIG. 4F

FIG. 5A

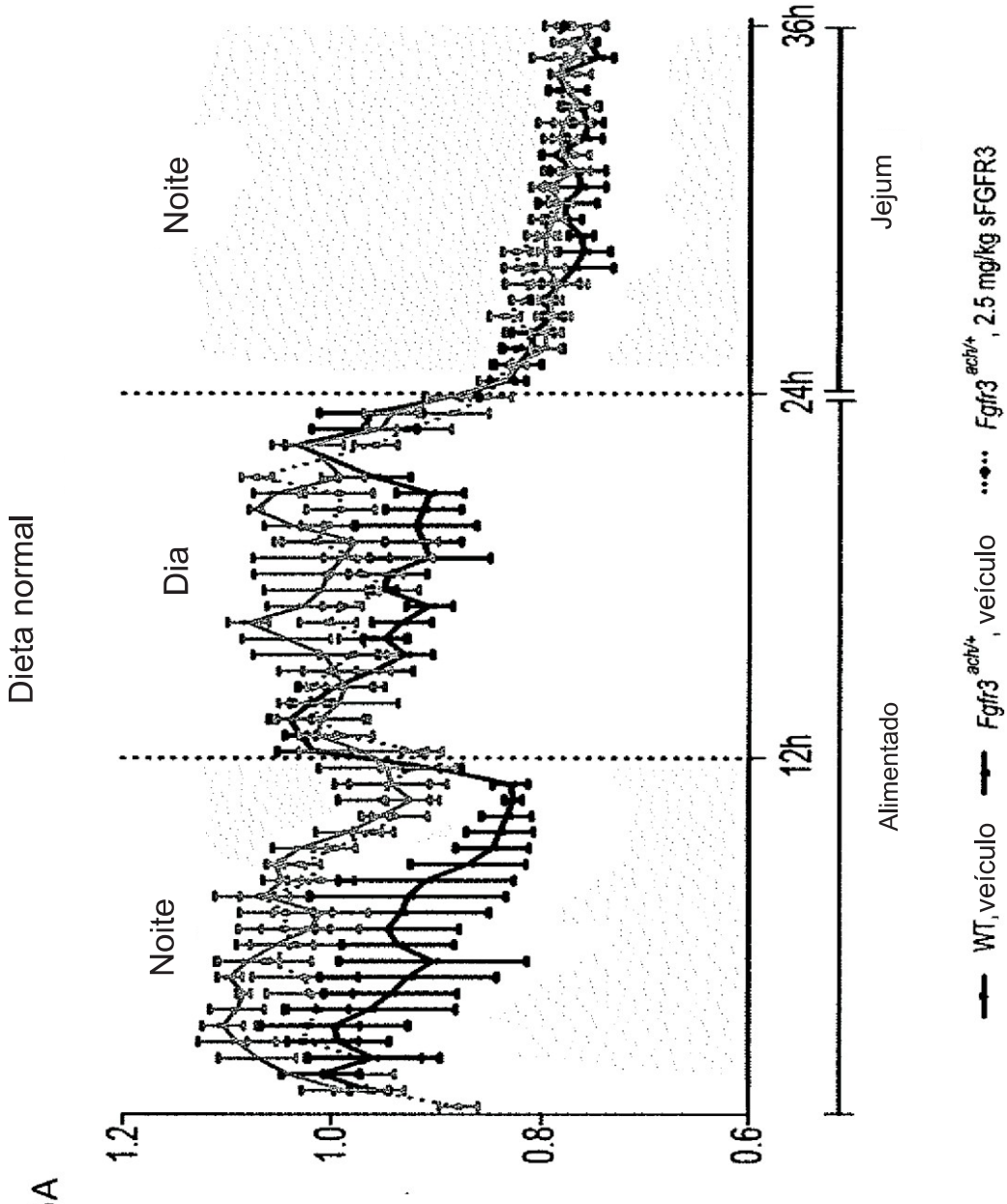

Dieta normal
Noite
Dia
Noite
1.2
1.0
0.8
0.6
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 5B

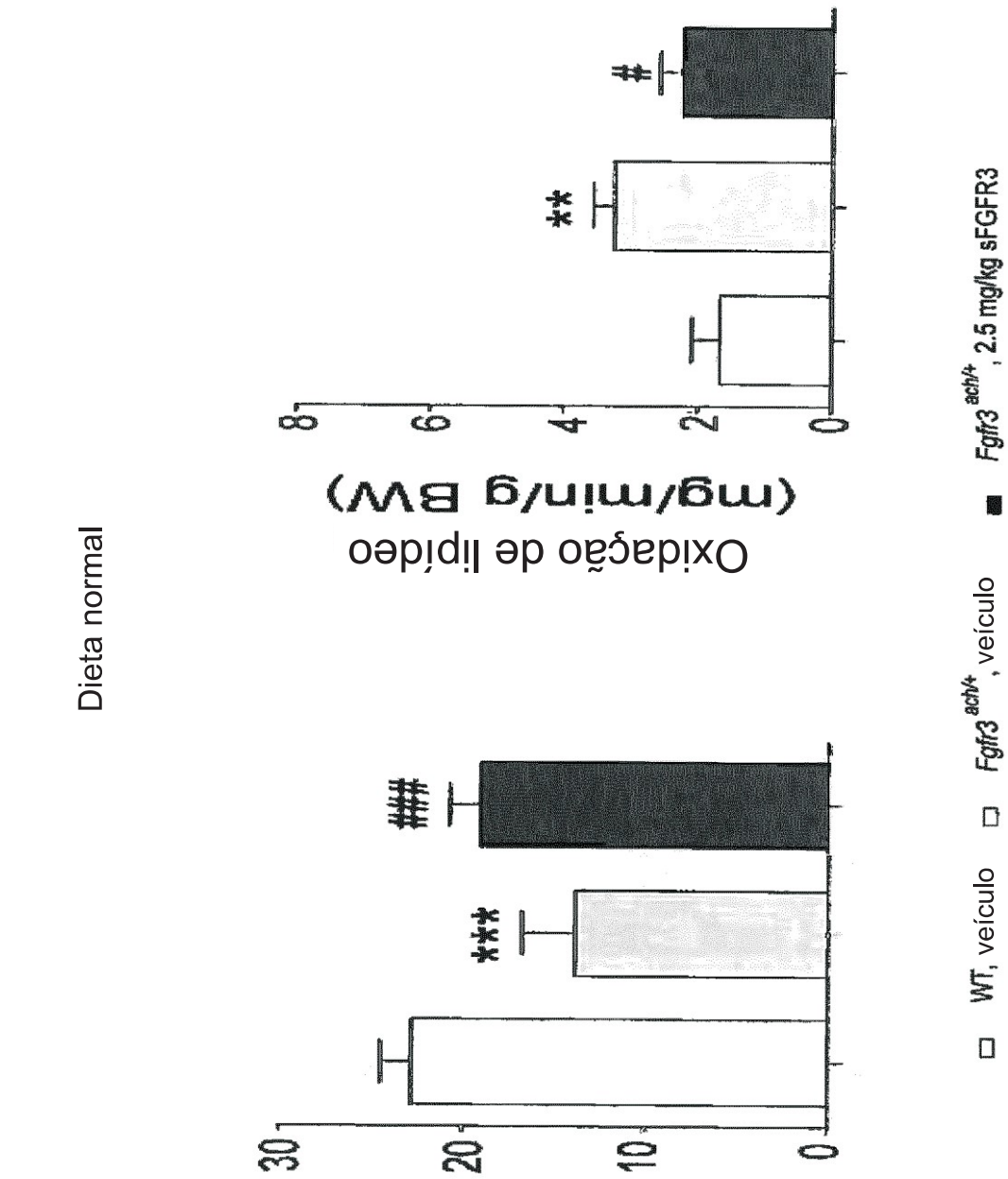

Dieta normal
Oxidação de carboidrato
(mg/min/g BW)
0
10
20
30
***
####
Oxidação de lipídeo
(mg/min/g BW)
0
2
4
6
8
**
#
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 5C

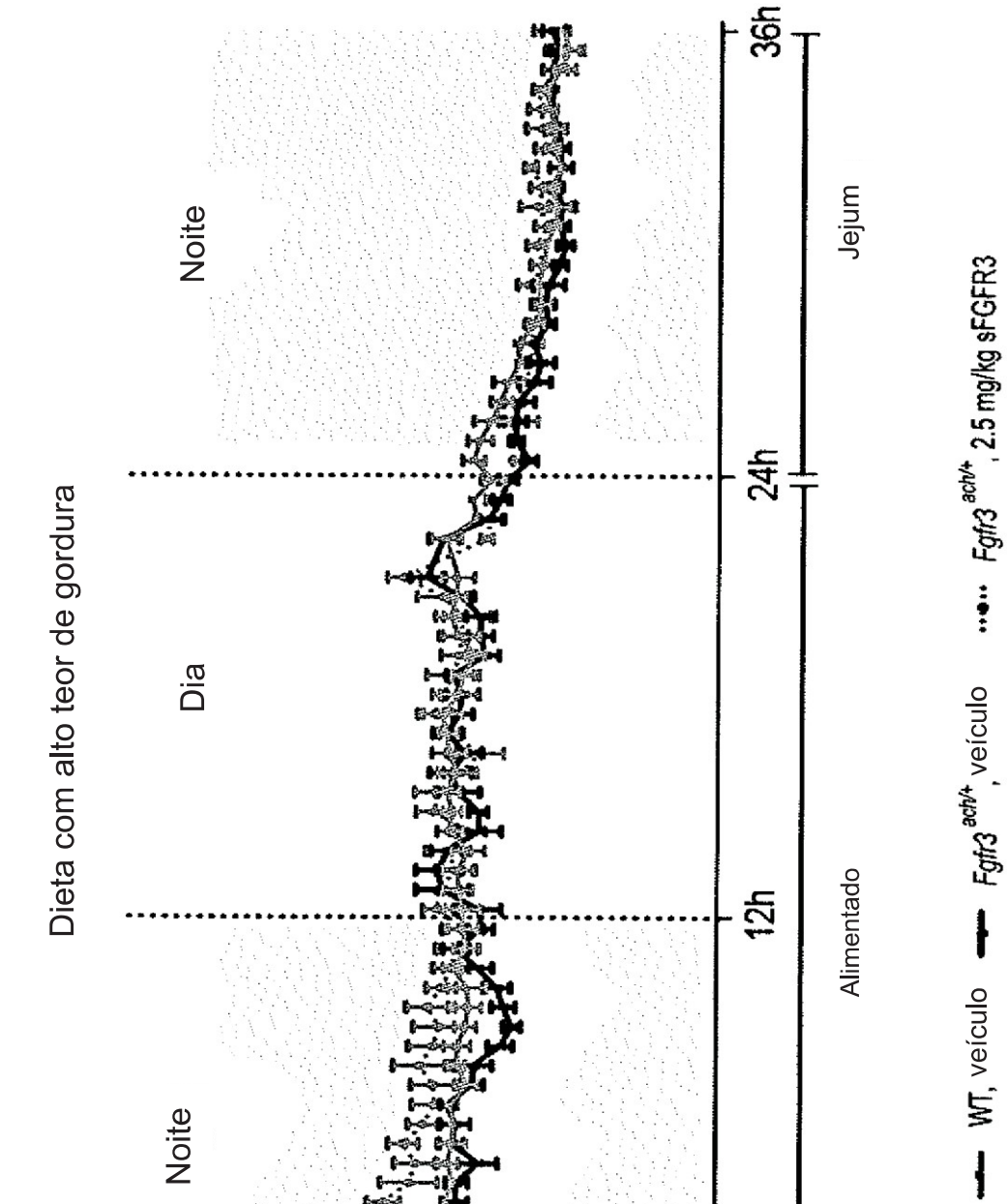
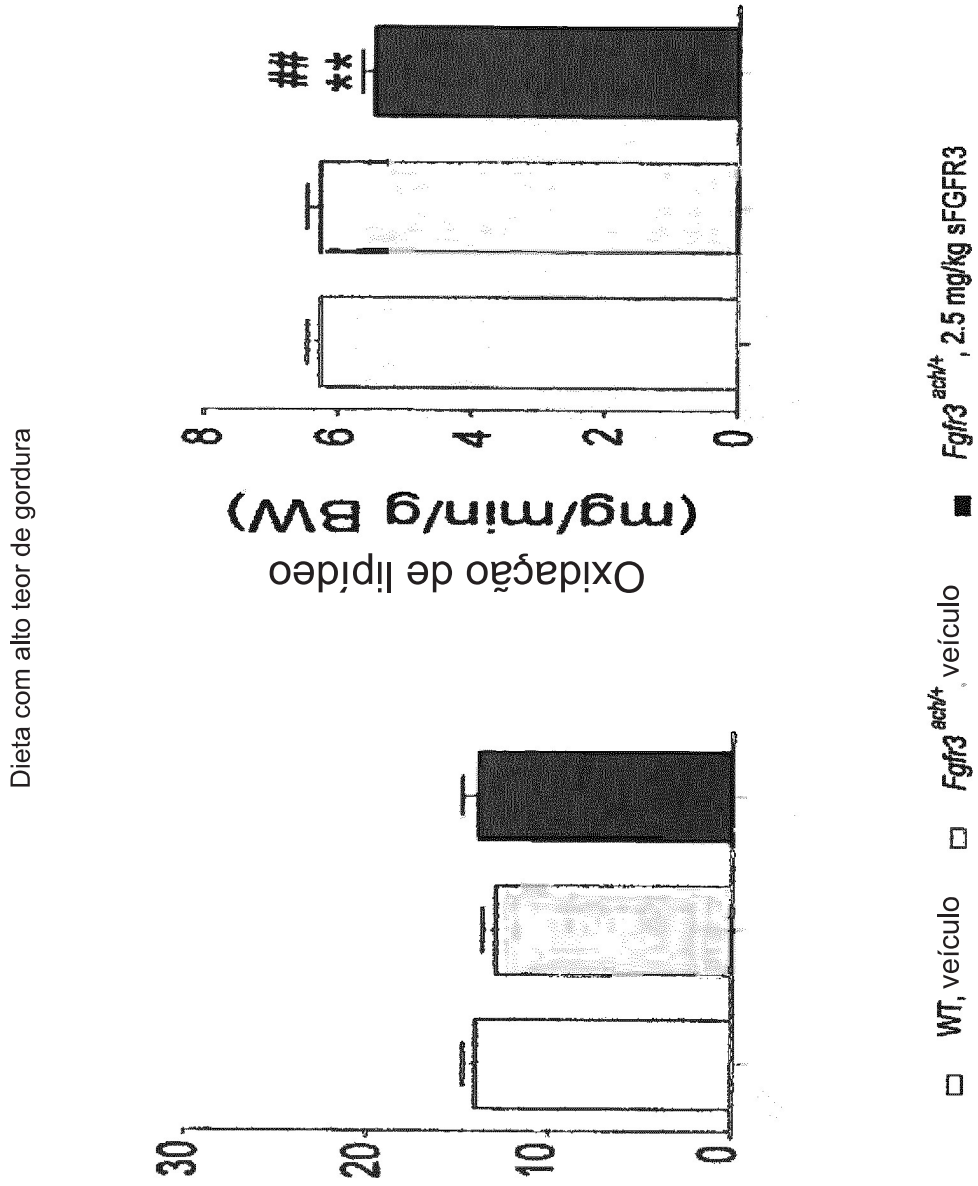
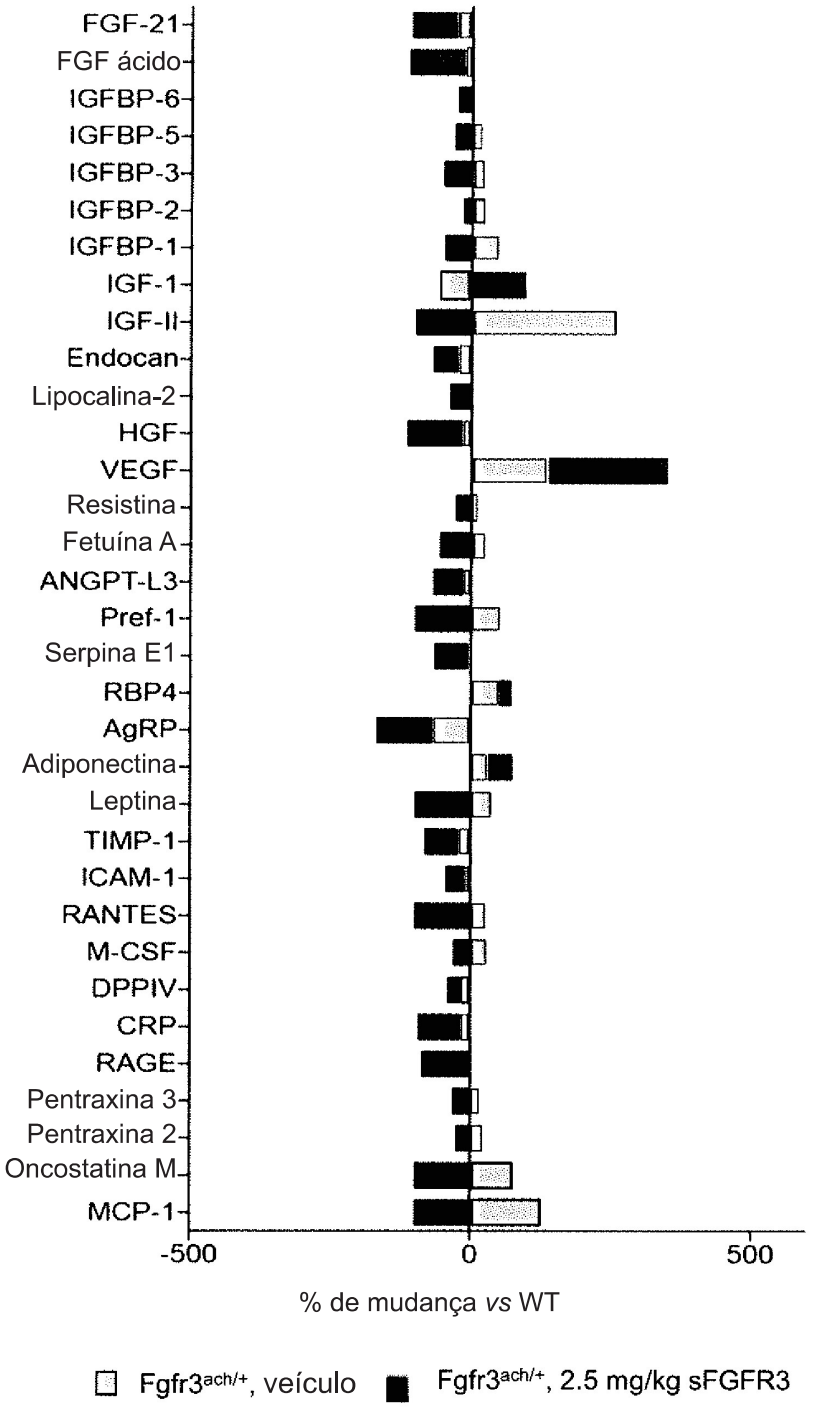

Dieta com alto teor de gordura
Noite
Dia
Noite
RQ
1.2
1.0
0.8
0.6
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 5D


Dieta com alto teor de gordura
Oxidação de carboidrato
(mg/min/g BW)
30
20
10
0
Oxidação de lipídeo
(mg/min/g BW)
8
6
4
2
0
##
**
□ WT, veículo
□ Fgfr3 ach/+ veículo
■ Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

ND

FIG. 6A


FGF-21
FGF ácido
IGFBP-6
IGFBP-5
IGFBP-3
IGFBP-2
IGFBP-1
IGF-1
IGF-II
Endocan
Lipocalina-2
HGF
VEGF
Resistina
Fetuína A
ANGPT-L3
Pref-1
Serpina E1
RBP4
AgRP
Adiponectina
Leptina
TIMP-1
ICAM-1
RANTES
M-CSF
DPPIV
CRP
RAGE
Pentraxina 3
Pentraxina 2
Oncostatina M
MCP-1
-500
0
500
% de mudança vs WT
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

HFD

FIG. 6B

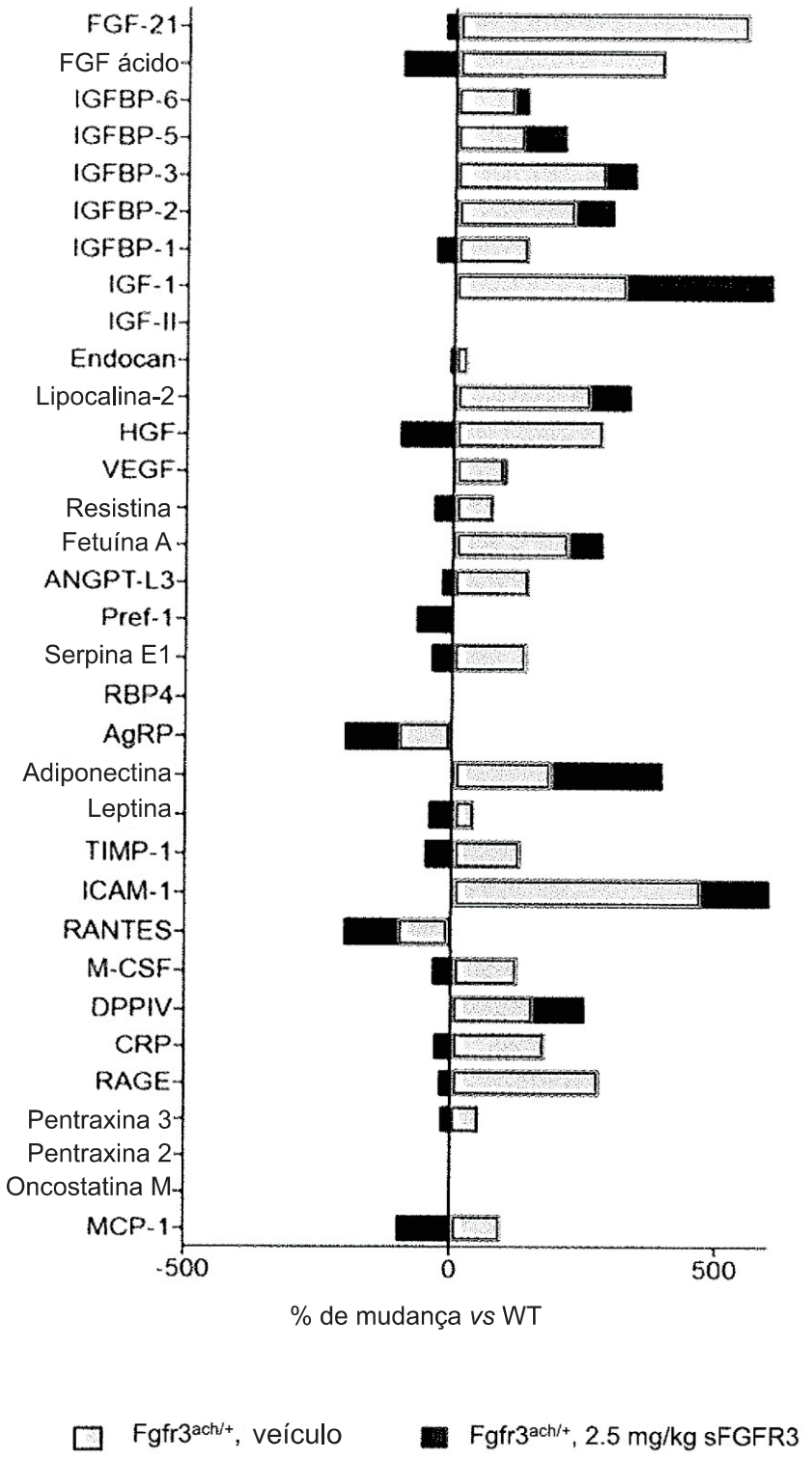
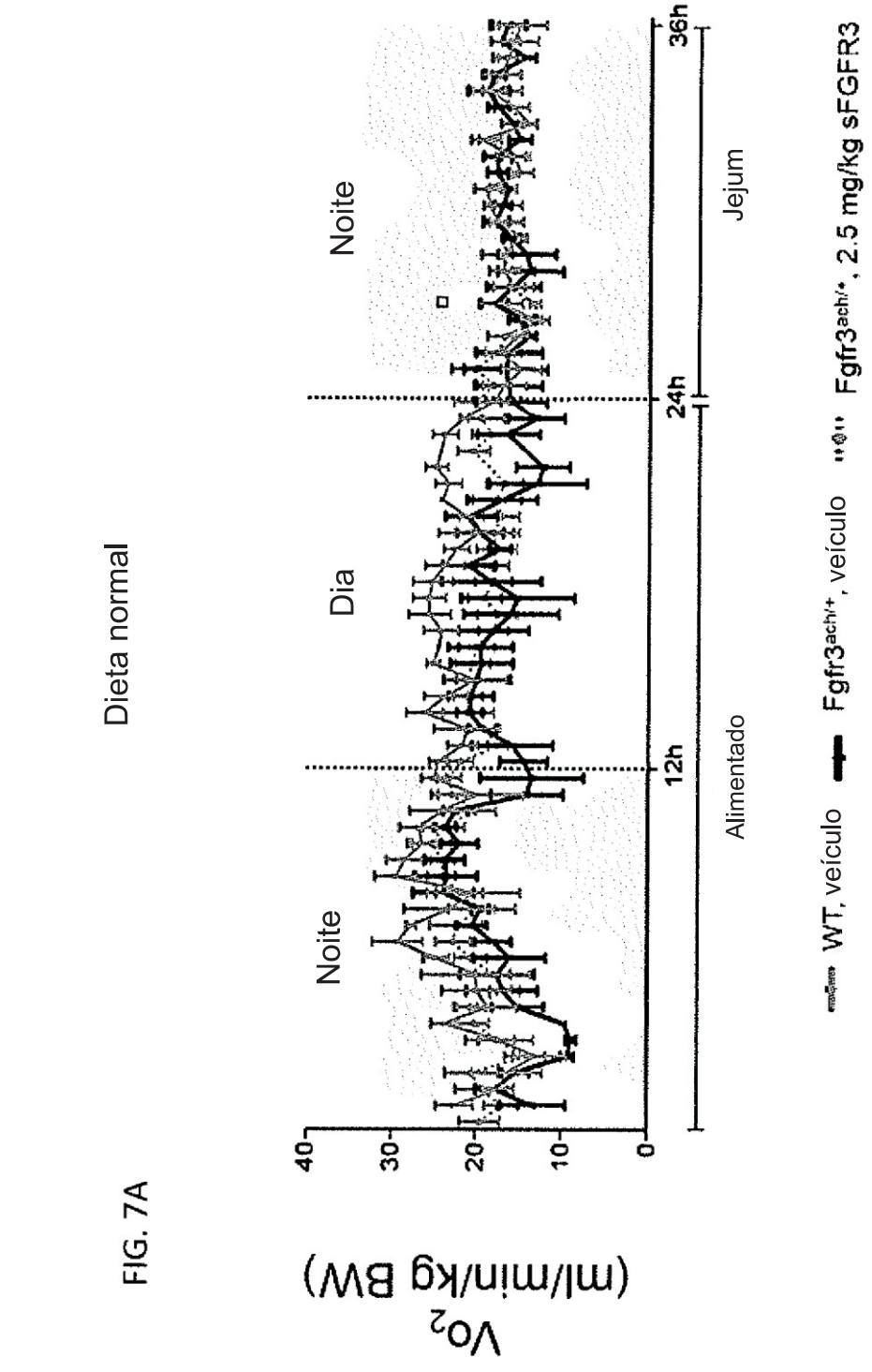

FGF-21
FGF ácido
IGFBP-6
IGFBP-5
IGFBP-3
IGFBP-2
IGFBP-1
IGF-1
IGF-II
Endocan
Lipocalina-2
HGF
VEGF
Resistina
Fetuína A
ANGPT-L3
Pref-1
Serpina E1
RBP4
AgRP
Adiponectina
Leptina
TIMP-1
ICAM-1
RANTES
M-CSF
DPPIV
CRP
RAGE
Pentraxina 3
Pentraxina 2
Oncostatina M
MCP-1
-500
0
500
% de mudança *vs* WT
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7A


Dieta normal
Noite
Dia
Noite
VO_2 (ml/min/kg BW)
40
30
20
10
0
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

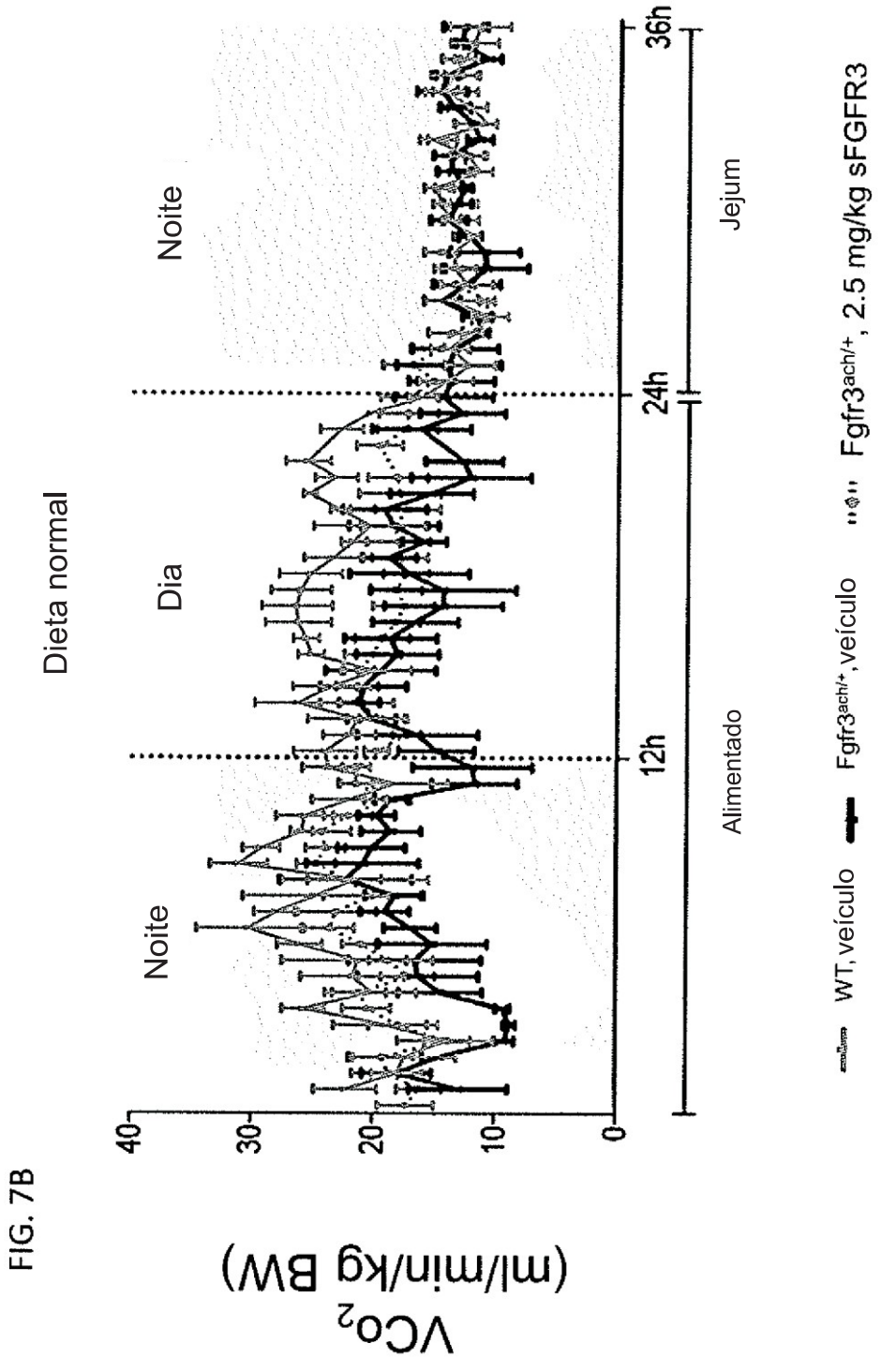

Dieta normal
Noite
Dia
Noite
VCo2 (ml/min/kg BW)
40
30
20
10
0
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7B

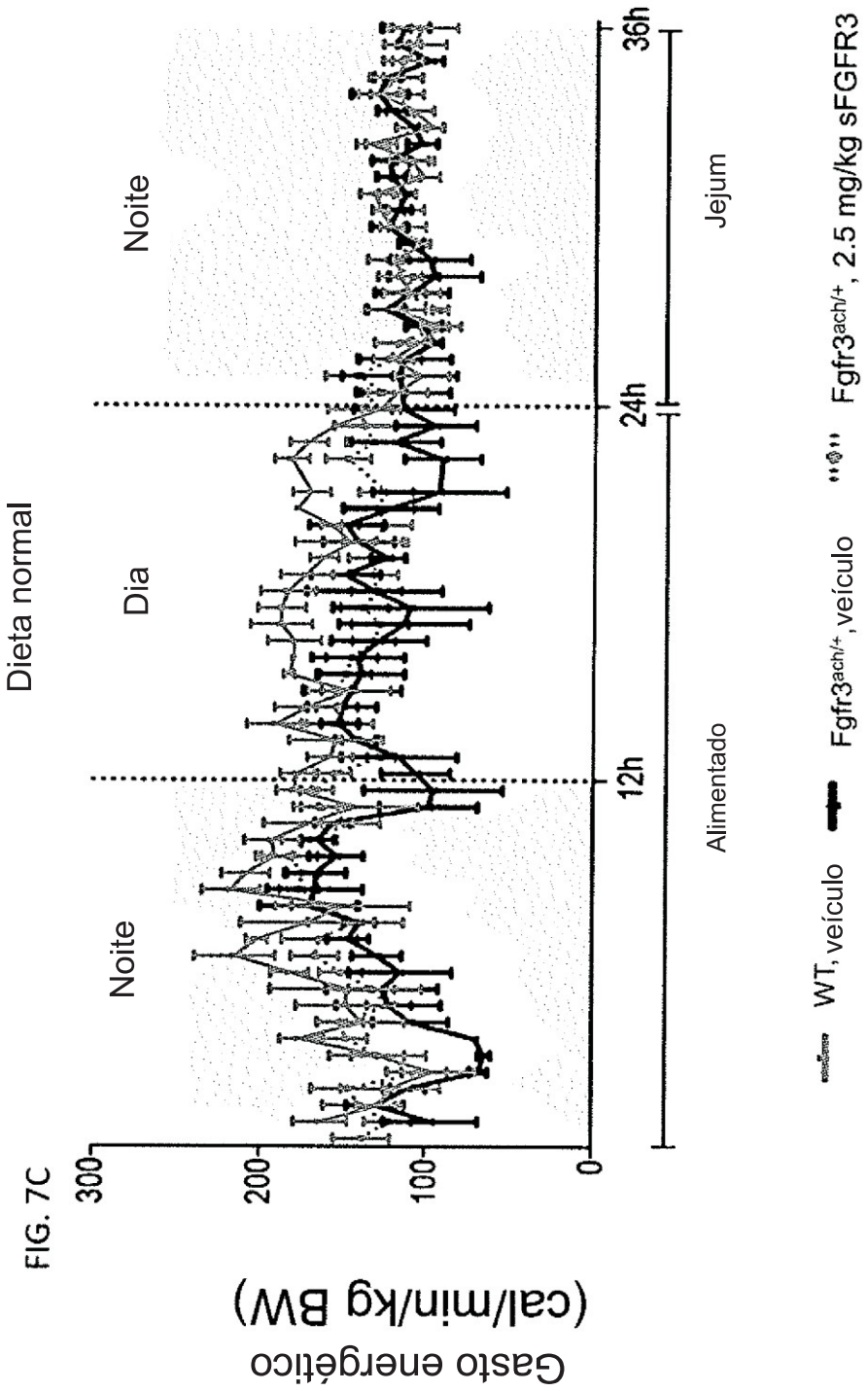

Dieta normal
Noite
Dia
Noite
Gasto energético
(cal/min/kg BW)
300
200
100
0
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7C

FIG. 7D

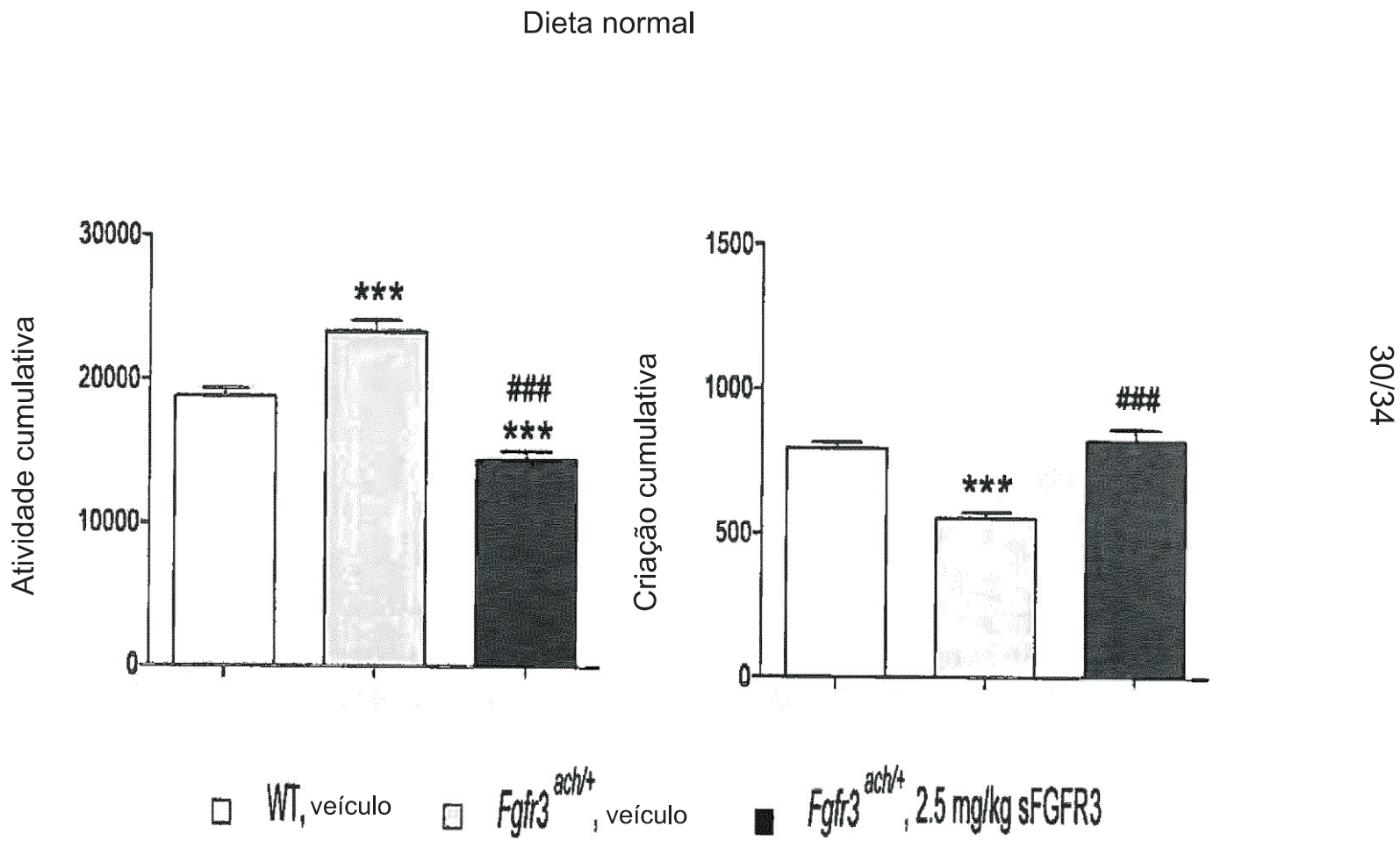
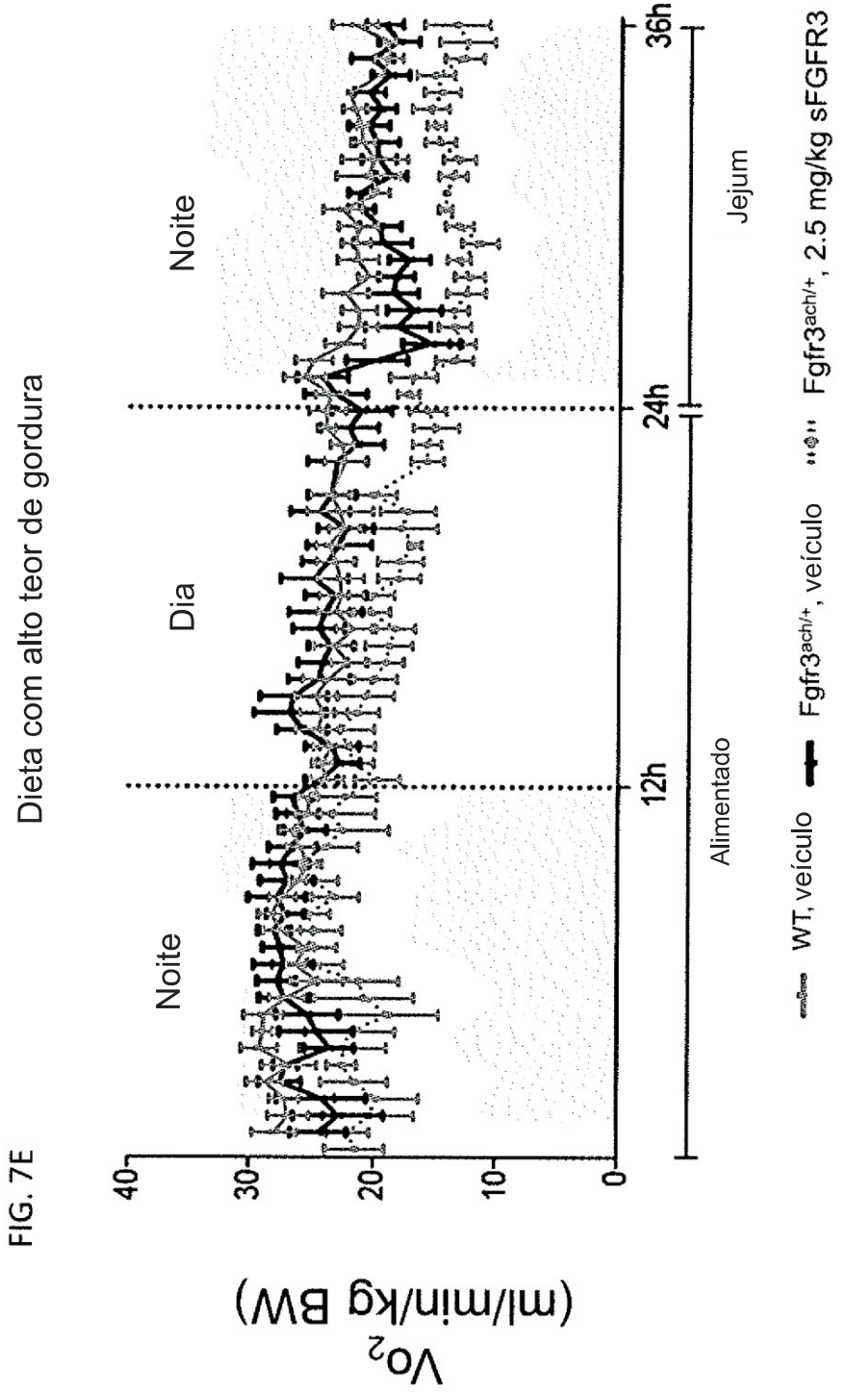

Dieta normal
Atividade cumulativa
30000
20000
10000
0
***
###
***
Criação cumulativa
1500
1000
500
0
***
###
WT, veículo
Fgfr3 ach/+, veículo
Fgfr3 ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7E


Dieta com alto teor de gordura
Noite
Dia
Noite
40
30
20
10
0
VO_2 (ml/min/kg BW)
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

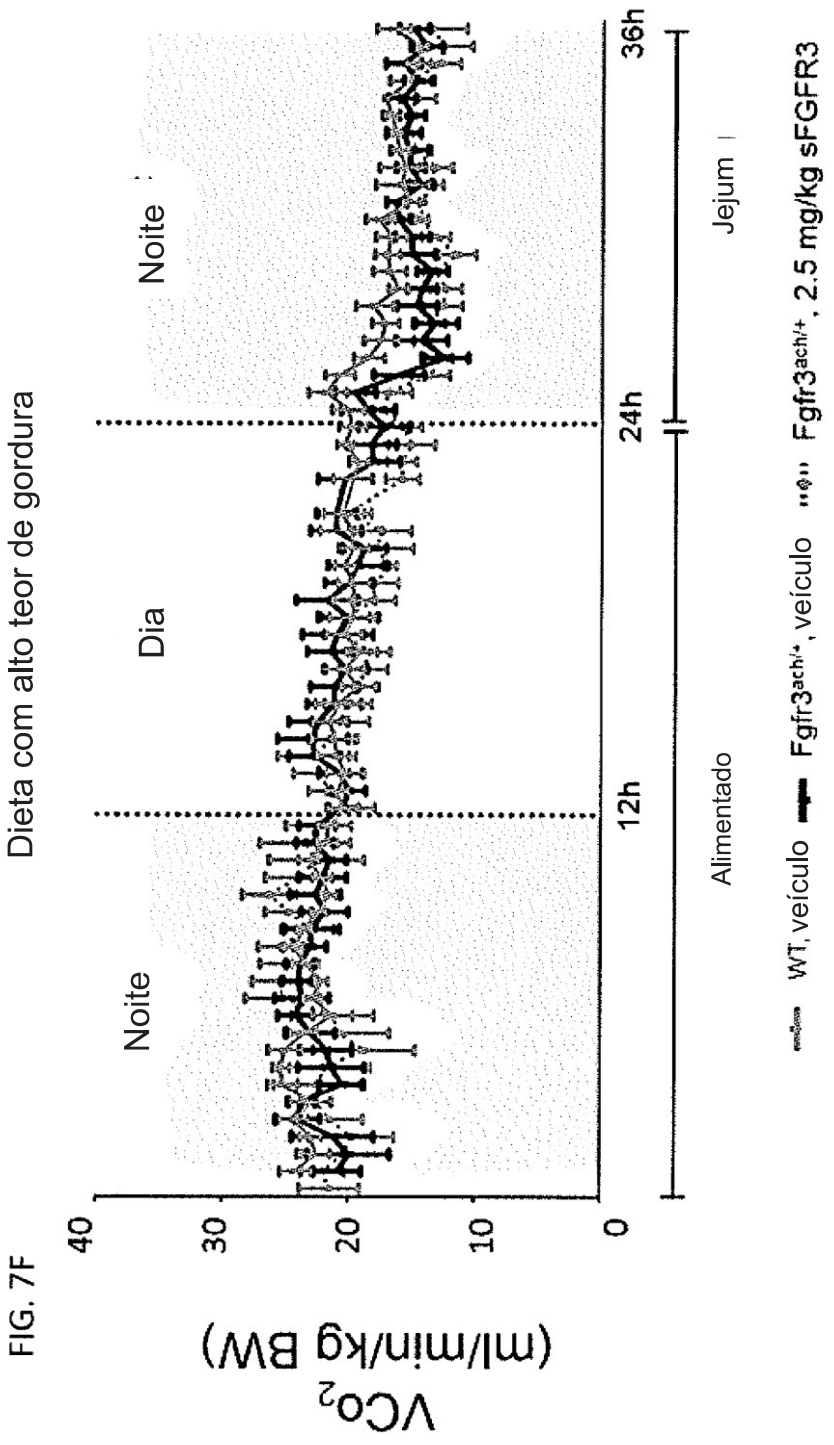

Dieta com alto teor de gordura
Noite
Dia
Noite
40
30
20
10
0
VCo2 (ml/min/kg BW)
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7F

FIG. 7G

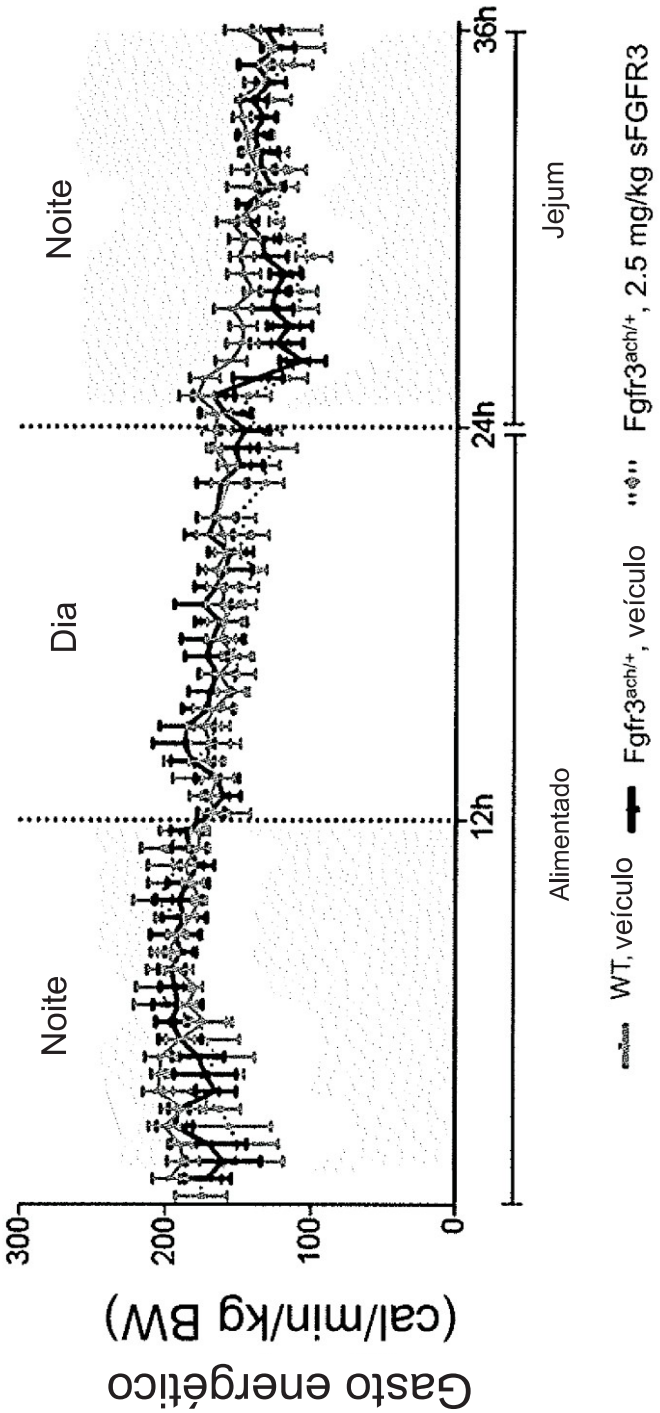
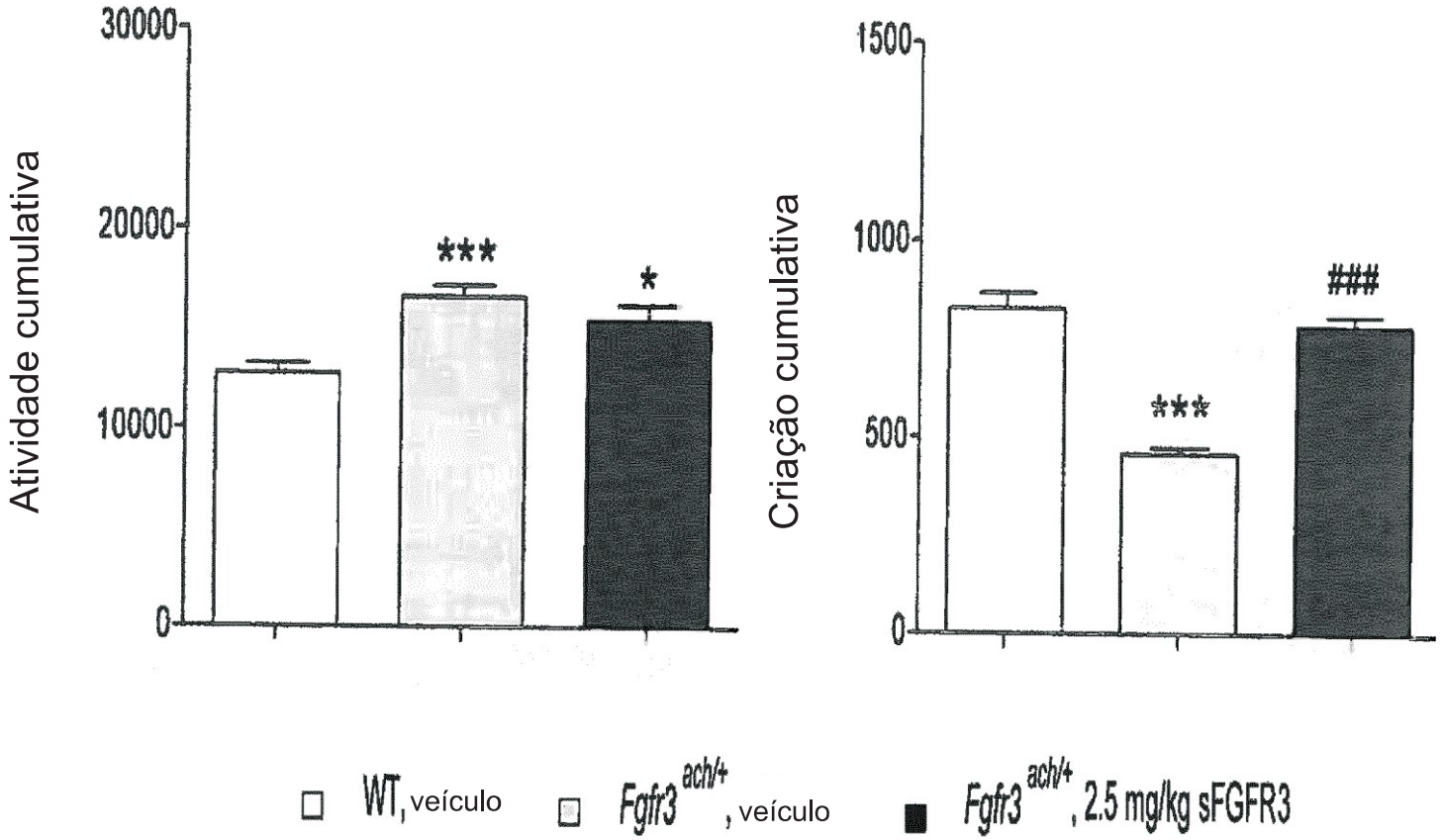

Gasto energético
(cal/min/kg BW)
300
200
100
0
Noite
Dia
Noite
Dieta com alto teor de gordura
12h
24h
36h
Alimentado
Jejum
WT, veículo
Fgfr3ach/+, veículo
Fgfr3ach/+, 2.5 mg/kg sFGFR3

FIG. 7H

Dieta com alto teor de gordura



RESUMO

Patente de Invenção: **"TRATAMENTO DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA VISCERAL ANORMAL USANDO POLIPEPTÍDEOS DE RECEPTOR 3 DE FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO SOLÚVEL (SFGFR3)".**

A invenção caracteriza métodos de usar polipeptídeos de sFGFR3 para tratar deposição de gordura visceral anormal e as condições associadas com deposição de gordura visceral anormal.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA - P245891.TXT
- Data de Geração do Código: 19/03/2020
- Hora de Geração do Código: 10:52:07
- Código de Controle:
  - Campo 1: 1F20B94C4CFFF6F8
  - Campo 2: 05321ED99894B433