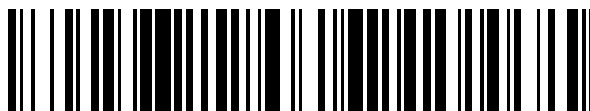


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 743**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2014 PCT/EP2014/050800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14111467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2014 E 14702206 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2945967**

54 Título: **Un polipéptido de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGR3) soluble para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos de retraso del crecimiento esquelético**

30 Prioridad:
16.01.2013 WO PCT/IB2013/001480

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2020

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (50.0%)**

72 Inventor/es:
GOUZE, ELVIRE

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 796 743 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un polipéptido de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGR3) soluble para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos de retraso del crecimiento esquelético

Campo de la invención:

- 5 La presente invención se refiere a la prevención o tratamiento de trastornos de retraso del crecimiento esquelético, en particular, enfermedades esqueléticas y craneosinostosis, desarrolladas en pacientes que exhiben mayor activación anormal del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3, por sus siglas en inglés), en particular, por la expresión de un mutante activado constitutivamente de FGFR3.

Antecedentes de la invención:

- 10 Numerosos factores de crecimiento regulan el desarrollo esquelético en los seres humanos.

Entre ellos, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) se ha descrito como un regulador negativo de la osificación endocondral. Se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica el FGFR3 son responsables del fenotipo de numerosas condrodisplasias esqueléticas (1), incluidas las displasias tanatóforicas (TDI y TDII) (2) y la acondroplasia (3), la forma más común de enanismo con extremidades cortas. Los niños que padecen acondroplasia sufren deformaciones del cráneo y las vértebras y desarrollo anormal de los huesos largo, que provocan baja estatura y complicaciones neurológicas y ortopédicas graves (4, 5). Los tratamientos existentes están diseñados solo para aliviar algunas de las complicaciones y son invasivos y extremos (6, 7).

La acondroplasia es un trastorno autosómico dominante causado por una mutación puntual en el gen para FGFR3 (Fgfr3ach) (8). En ~97 % de los pacientes afectados, la causa de la acondroplasia es una sustitución G380R en el dominio transmembranario del receptor (9, 10). Esta mutación en FGFR3 provoca un aumento de función (11), que prolonga la activación de la actividad de tirosina cinasa del receptor (12, 13). El FGFR3 mutante por G380R permanece dependiente del ligando para su dimerización y activación (12, 14); sin embargo, la presencia de la mutación estabiliza el complejo ligando/receptor (15) y enlentece la internalización del receptor (12), que extiende así la señalización de la vía Ras/MAPK intracelular posterior (12). La señalización de FGFR3 resultante se prolonga e inhibe de manera continua la proliferación y diferenciación de condrocitos en la placa de crecimiento (16). Las células que expresan el receptor mutante no maduran y no son reemplazadas por la matriz ósea mineralizada, lo que afecta el alargamiento de todos los huesos formados por la osificación endocondral (17, 18). Estos incluyen los huesos largos del esqueleto de las extremidades, así como las vértebras, el esternón, la base del cráneo y algunos huesos en el cráneo donde el crecimiento óseo se produce en sincondrosis, que son estructuras cartilaginosas que consisten en dos placas de crecimiento opuestas con una zona común de condrocitos en reposo. Como con las placas de crecimiento endocondrales en los huesos largos, las sincondrosis también se reemplazan con hueso.

A pesar de una mayor cantidad de estudios para descifrar los mecanismos responsables de las alteraciones en el crecimiento óseo, todavía no hay una cura disponible. Se consideran diversas estrategias terapéuticas dirigidas al FGFR3 mutante y su señalización posterior (16). Recientemente, Jin *et al.* evaluaron un nuevo péptido que inhibe la señalización de FGFR3 en un modelo murino de TDII (19). Este estudio muestra la reversión de la letalidad neonatal de ratones con TDII después del tratamiento *in utero* y demuestra la viabilidad preliminar de que dirigirse al FGFR3 en el compartimiento extracelular puede ser una estrategia eficaz para tratar las displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3.

Las terapias actuales para la acondroplasia incluyen cirugías ortopédicas tales como alargamiento de piernas y terapia con hormona de crecimiento. Sin embargo, el alargamiento de las piernas causa un gran dolor a los pacientes y la terapia con hormona de crecimiento aumenta la altura corporal por medio de inyecciones periódicas de hormona de crecimiento desde la infancia. Además, el crecimiento se detiene cuando se suspenden las inyecciones. En consecuencia, es deseable desarrollar una nueva terapia para la acondroplasia, así como otros trastornos de retraso del crecimiento esquelético, incluidas enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3. Cassagnaud *et al.* (European Society of Gene Therapy Collaborative Congress, 2012, o. A76-A77) sugieren el uso de un FGFR3 soluble para tratar una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3, tal como la acondroplasia, pero no describen ninguno adecuado, mucho menos estructuras ventajosas de dichos polipéptidos. Terada *et al.* (Mol. Cell Biol. Res. Comm. 4:365-373, 2001) describen FGFR3 con un dominio extracelular corto (310 aminoácidos incluido el péptido señal) que tiene la capacidad de unirse a FGF.

- 50 Compendio de la invención:

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 soluble (sFGFR3) aislado para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 en un sujeto que lo necesita, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3, comprende un dominio intracelular de FGFR3 y carece de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio transmembranario de FGFR3, y en donde, opcionalmente, el polipéptido de sFGFR3 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar así una inmunoadhesina de sFGFR3.

En un segundo aspecto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de sFGFR3 aislado según el primer aspecto y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3.

5 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de sFGFR3 aislado, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3, comprende un dominio intracelular de FGFR3 y carece de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio transmembranario de FGFR3, y en donde, opcionalmente, el polipéptido de sFGFR3 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar así una inmunoadhesina de sFGFR3, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Descripción detallada de la invención:

Los inventores han diseñado una estrategia terapéutica eficaz para la acondroplasia al restaurar el crecimiento óseo. Como se muestra en la presente memoria, la administración posnatal de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos soluble 3 (sFGFR3) recombinante que actúa como un receptor señuelo a ratones *Fgfr3^{ach/+}* (un modelo murino de acondroplasia que exhibe un fenotipo esencialmente idéntico a la patología humana, con acortamiento de todos los huesos formados por osificación endocondral) resulta en el crecimiento esquelético normal que previene la aparición de síntomas y complicaciones de la acondroplasia.

15 Como se describe en la presente memoria, inyecciones subcutáneas repetidas de sFGFR3 recombinante a lo largo del período de crecimiento, se puede restaurar el crecimiento esquelético normal en ratones *Fgfr3^{ach/+}* transgénicos, lo que resulta en una longitud corporal normal y disminución significativa de complicaciones asociadas. Se restauró la maduración eficaz de condrocitos de placa de crecimiento en ratones tratados, lo que resultó en una mejora dependiente de la dosis del crecimiento esquelético en ratones *Fgfr3^{ach/+}*. Esto resultó en una estatura normal asociada a una disminución significativa en la cantidad e intensidad de complicaciones, sin ningún indicio de toxicidad. Estos resultados validan el uso de FGFR3 soluble para restaurar el crecimiento óseo e indican su posible uso como una terapia prometedora para la acondroplasia y trastornos esqueléticos relacionados.

25 Usos terapéuticos:

La presente invención proporciona usos de un polipéptido de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos soluble 3 (sFGFR3) aislado y composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar un trastorno de retraso del crecimiento esquelético.

30 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un polipéptido de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 soluble (sFGFR3) aislado para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética en un sujeto que lo necesita, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3, comprende un dominio intracelular de FGFR3 y carece de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio transmembranario de FGFR3, y en donde, opcionalmente, el polipéptido de sFGFR3 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar así una inmunoadhesina de sFGFR3.

35 La enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 es un trastorno de retraso del crecimiento esquelético.

Los términos "receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3" ("FGFR3") o "receptor FGFR3", como se usan en la presente memoria, se refieren a cualquier polipéptido de FGFR3 natural o variante. El gen *FGFR3*, que está ubicado en el brazo corto distal del cromosoma 4, codifica un precursor de proteína de 806 aminoácidos (precursor de la isoforma 1 del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3). El receptor FGFR3 comprende un dominio extracelular, un dominio transmembranario y un dominio intracelular. El gen *FGFR3* humano de origen natural tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en el número de acceso a Genbank NM_000142.4 y la proteína FGFR3 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso a Genbank NP_000133 y que se representa mediante la SEQ ID NO: 3 a continuación):

MGAPACALALCVAVAIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFGSGDA
VELSCPPPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYSCRQR
LTQRVLCFHSVRVTDAPSSGDDDEDGEDEAEDTGVDTGAPYWTRPERMDKLLAVPA
ANTVRFRCPAAGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQWQSLVMESVVPDRGN
YTCVVENKFGSIRQTYTLDVLEERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDVEFHCKVYSDAQ
PHIQWLKHVEVNGSKVGPDPYVTVLKTAGANTTDKELEVLSLHNVTFEDAGEYT
CLAGNSIGFSHHSAWLVVLPAAEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLC
RLRSPKKGLGSPTVHKISRFLKRQVSLESNASMSSNTPLVRIARLSSGEGPTLANVS
ELELPADPKWELSRARLTGKPLGEGCFGQVVMMAEAIGIDKDRAAKPVTVAVKMLK
DDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQGGPLYVLVEYAAKGNLREFL
RARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHRDLAARNVL
VTEDNVMKIADFGGLARDVHNLDDYKKTNGRLPVKWMapeALFDRVYTHQSDVW
SFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMRECWHAAP
SQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSSSSSGDSDVFAHDL
LPPAPPSSGGSRT

5 Como se usan en la presente memoria, los términos "dominio extracelular de FGFR3" o "dominio extracelular de FGFR3" se refieren a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que va desde las posiciones 1 a 375 de la SEQ ID NO: 3 (secuencia que está aparece subrayada más atrás).

10 El término "polipéptido" significa en la presente memoria un polímero de aminoácidos que no tiene una longitud específica. Por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos en la definición de "polipéptido" y estos términos se usan de manera intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva, así como en las reivindicaciones. El término "polipéptido" no excluye modificaciones posteriores a la traducción que incluyen, pero no se limitan a, fosforilación, acetilación, glicosilación y similares.

Se entiende por polipéptido "aislado" que el polipéptido no está presente dentro de un organismo vivo, p. ej., dentro del cuerpo humano. Sin embargo, el polipéptido aislado puede ser parte de una composición o un kit. El polipéptido aislado está preferiblemente purificado.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "soluble" se refiere a un polipéptido que no está unido a la membrana celular. Habitualmente, un receptor está en forma soluble cuando su secuencia de aminoácidos carece de dominio transmembranario. En este contexto, una forma será soluble si, al usar ensayos convencionales conocidos para un experto en la técnica, se puede detectar la mayor parte de esta forma en fracciones que no están asociadas a la membrana, p. ej., en sobrenadantes celulares o suero.

20 Un polipéptido de "secuencia natural" se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen natural de cualquier mamífero (incluidos seres humanos). Dichos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar a partir de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia natural" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (p. ej., una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (e. g., formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

25 Un polipéptido "variante" se refiere a un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido de secuencia natural. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en donde uno o más residuos aminoacídicos se agregan o eliminar, en el extremo N o C del polipéptido. Normalmente, una variante tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos e, incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al polipéptido de secuencia natural.

30 Se entiende por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta, excepto que la secuencia del polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de

aminoácidos de consulta, hasta 5 % (5 de 100) de los residuos aminoacídicos en la secuencia objeto pueden tener inserciones, eliminaciones o sustituciones por otro aminoácido.

5 En el marco de la presente memoria descriptiva, el porcentaje de identidad se calcula al usar una alineación global (es decir, las dos secuencias se comparan en toda su longitud). Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias se conocen en la técnica. Se puede usar, por ejemplo, el programa "needle", que usa el algoritmo de alineación global Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para encontrar la alineación óptima (incluidos espacios) de dos secuencias cuando se toma en consideración su longitud total. El programa needle está disponible, por ejemplo, en el sitio web ebi.ac.uk en todo el mundo. El porcentaje de identidad según la invención se calcula preferiblemente mediante el uso del programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de "Abertura de espacio" igual a 10,0, un parámetro de "Extensión de espacio" igual a 0,5 y una matriz Blosum62.

15 Los polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos "al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica" a la secuencia de referencia pueden comprender mutaciones tales como eliminaciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. El polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de referencia puede corresponder a una variante alélica de la secuencia de referencia. Puede comprender, por ejemplo, solo sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. Las sustituciones preferiblemente corresponden a sustituciones conservadoras como se indica en la tabla a continuación.

Sustituciones conservadoras	Tipo de aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas, pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

20 Un polipéptido de FGFR3 soluble ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad biológica de las proteínas FGF al unirse a estas proteínas e impedir de esta forma que se unan a FGFR3 presente en la superficie de células diana. No es deseable que un polipéptido de FGFR3 soluble se asocie a la membrana celular.

25 Los términos "polipéptido de FGFR3 soluble" o "sFGFR3", como se usan en la presente memoria, se refieren a un polipéptido que comprende o consiste en la región extracelular del receptor FGFR3 o una variante o un fragmento de esta.

En la presente memoria se describe un sFGFR3 que puede incluir todo el dominio extracelular de FGFR3 humano, excepto la segunda mitad del tercer dominio similar a Ig (Ig IIIb) y el dominio transmembranario de FGFR3 (es decir, un polipéptido que comprende o consiste en una secuencia de 694 aminoácidos derivada del receptor FGFR3 humano, como se muestra mediante la SEQ ID NO: 1 a continuación):

ES 2 796 743 T3

MGAPACALALCVAVAIVAGASSESLGTEQRVVGRAAEVPGPEPGQQEQLVFG
SGDAVELSCPPPGGGPMGPTVWVKDGTGLVPSERVLVGPQRLQVLNASHEDSGAYS
CRQRLTQRVLCHFVSVRVTDAVSSGDDDEDEDEAEEDTGVDTGAPYWTRPERMDKKLL
AVPAANTVRFRCPAAGNPTPSISWLKNGREFRGEHRIGGIKLRHQWVSLVMESVVPS
DRGNYTCVVENKFGSIRQTYTLDVLERSPHRPILQAGLPANQTAVLGSDFEFHCKVY
SDAQPHIQWLKHVEVNGSKVGPDPYVTVLKVSLASNAMSSNTPLVRIARLSSGE
GPTLANVSELELPADPKWELSRARLTGKPLGEGCFGQVVMMAEAIGIDKDRAAKPVT
VAVKMLKDDATDKDLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQGGPLYVLVEYAA
KGNLREFLRARRPPGLDYSFDTCKPPEEQLTFKDLVSCAYQVARGMEYLASQKCIHR
DLAARNVLTEDNVMKIADFGLARDVHNLDYKKTNGRLPVKWMPEALFDRVY
THQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPANCTHDLYMIMR
ECWHAAPSQRPTFKQLVEDLDRVLTVTSTDEYLDLSAPFEQYSPGGQDTPSSSSSGDD
SVFAHDLLPPAPPSSGGSRT

Este polipéptido de sFGFR3 está codificado por una secuencia de ácido nucleico definida por la SEQ ID NO: 2 (a continuación).

ES 2 796 743 T3

ATGGGCGCCCCTGCCTGCGCCCTCGCGCTCTGCGTGGCCGTGGCCATCGTG
GCCGGCGCCTCCTCGGAGTCCTTGGGGACGGAGCAGCGCGTCGTGGGGCGAGCG
GCAGAAGTCCCGGGCCCAAGAGCCCGGCCAGCAGGAGCAGTTGGTCTTCGGCAGC
GGGGATGCTGTGGAGCTGAGCTGTCCCCGCCCCGGGGGTGGTCCCATGGGGCCCA
CTGTCTGGGTCAAGGATGGCACAGGGCTGGTGCCCTCGGAGCGTGTCTGGTGGG
GCCCCAGCGGCTGCAGGTGCTGAATGCCTCCCACGAGGACTCCGGGGCCTACAGC
TGCCGGCAGCGGCTCACGCAGCGCTACTGTGCCACTTCAGTGTGCGGGTGACAG
ACGCTCCATCCTCGGGAGATGACGAAGACGGGGAGGACGAGGCTGAGGACACAG
GTGTGGACACAGGGGCCCTTACTGGACACGGCCCCGAGCGGATGGACAAGAAGC
TGCTGGCCGTGCCGGCCGCAACACCGTCCGCTTCCGCTGCCCAGCCGCTGGCAA
CCCCACTCCCTCCATCTCCTGGCTGAAGAACGGCAGGGAGTTCCGCGGGCAGCAC
CGCATTGGAGGCATCAAGCTGCGGCATCAGCAGTGGAGCCTGGTCATGGAAAGC
GTGGTGCCTCGGACCGCGGCAACTACACCTGCGTCGTGGAGAACAAGTTTGGCA
GCATCCGGCAGACGTACACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTCCCCGCACCGGCCCAT
CCTGCAGGCGGGGCTGCCGGCCAACCAGACGGCGGTGCTGGGCAGCGACGTGGA
GTTCCACTGCAAGGTGTACAGTGACGCACAGCCCCACATCCAGTGGCTCAAGCAC
GTGGAGGTGAATGGCAGCAAGGTGGGCCCGGACGGCACACCCTACGTTACCGTG
CTCAAGGTGTCCCTGGAGTCCAACGCGTCCATGAGCTCCAACACACCACTGGTGC
GCATCGCAAGGCTGTCTCAGGGGAGGGCCCCACGCTGGCCAATGTCTCCGAGCT
CGAGCTGCCTGCCGACCCCAAATGGGAGCTGTCTCGGGCCCGGCTGACCCTGGGC
AAGCCCCTTGGGGAGGGCTGCTTCGGCCAGGTGGTCATGGCGGAGGCCATCGGC
ATTGACAAGGACCGGGCCGCAAGCCTGTCACCGTAGCCGTGAAGATGCTGAAA
GACGATGCCACTGACAAGGACCTGTCGGACCTGGTGTCTGAGATGGAGATGATG
AAGATGATCGGGAAACACAAAACATCATCAACCTGCTGGGCGCCTGCACGCAG
GGCGGGCCCCTGTACGTGCTGGTGGAGTACGCGGCCAAGGGTAACCTGCGGGAG
TTTCTGCGGGCGCGGCGGCCCCCGGGCCTGGACTACTCCTTCGACACCTGCAAGC
CGCCCCGAGGAGCAGCTCACCTTCAAGGACCTGGTGTCTGTGCCTACCAGGTGGC
CCGGGGCATGGAGTACTTGGCCTCCAGAAAGTGCATCCACAGGGACCTGGCTGCC

CGCAATGTGCTGGTGACCGAGGACAACGTGATGAAGATCGCAGACTTCGGGCTG
 GCCCCGGGACGTGCACAACCTCGACTACTACAAGAAGACAACCAACGGCCGGCTG
 CCCGTGAAGTGGATGGCGCCTGAGGCCCTTGTTTGACCGAGTCTACACTCACCAGA
 GTGACGTCTGGTCCTTTGGGGTCTGCTCTGGGAGATCTTACGCTGGGGGGCTC
 CCCGTACCCCGGCATCCCTGTGGAGGAGCTCTTCAAGCTGCTGAAGGAGGGCCAC
 CGCATGGACAAGCCCGCCAACCTGCACACACGACCTGTACATGATCATGCGGGAG
 TGCTGGCATGCCGCGCCCTCCCAGAGGCCACCTTCAAGCAGCTGGTGGAGGACC
 TGGACCGTGTCTTACCGTGACGTCCACCGACGAGTACCTGGACCTGTGCGGCGCC
 TTTCGAGCAGTACTCCCCGGGTGGCCAGGACACCCCCAGCTCCAGCTCCTCAGGG
 GACGACTCCGTGTTTGCCACGACCTGCTGCCCCCGGCCCCACCCAGCAGTGGGG
 GCTCGCGGACG

Dicha secuencia de ácido nucleico se ha optimizado para disminuir el contenido de GC (mientras codifica la secuencia del polipéptido natural) para prolongar la semivida del ARNm, así como para facilitar la subclonación.

5 Un "equivalente funcional" es una molécula (p. ej., un polipéptido recombinante) que conserva la actividad biológica y la especificidad del polipéptido original. Por lo tanto, el término "equivalente funcional de sFGFR3" incluye variantes y fragmentos del polipéptido al cual hace referencia (es decir, el polipéptido de sFGFR3) siempre que los equivalentes funcionales exhiban al menos una, preferiblemente todas, de las actividades biológicas del polipéptido de referencia, por ejemplo, conserva la capacidad de unirse a la proteína FGF. Como se usa en la presente memoria, "que se une específicamente" significa que el fragmento biológicamente activo tiene elevada afinidad por FGF, pero no por proteínas testigo. La unión específica se puede medir mediante varias técnicas tales como ELISA, citometría de flujo, transferencia western o inmunoprecipitación. Preferiblemente, el equivalente funcionalmente se une específicamente a FGF a niveles nanomolares o picomolares.

15 El polipéptido según la invención abarca polipéptidos que comprenden o consisten en fragmentos de al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular de FGFR3, siempre que los fragmentos sean biológicamente activos. En el marco de la invención, el fragmento biológicamente activa puede comprender, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3.

20 Se entiende por "actividad biológica" de un equivalente funcional de la región extracelular del receptor FGFR3 (i) la capacidad de unirse a FGF; y/o (ii) la capacidad de reducir la señalización intracelular de FGF (p. ej., la fosforilación Erk después de la activación del receptor FGFR3 mediante su unión a FGF); y/o (iii) la capacidad de restaurar el crecimiento óseo *in vivo* (p. ej., en ratones *Fgfr3^{ach/+}*).

25 El experto en la técnica puede determinar fácilmente si un equivalente funcional de la región extracelular de FGFR3 es biológicamente activo. Para verificar si los polipéptidos recientemente generados se unen a FGF y/o reducen la señalización intracelular de FGF del mismo modo que el polipéptido de sFGFR3 caracterizado inicialmente (un polipéptido que consiste en la secuencia representada en SEQ ID NO: 1), se puede llevar a cabo un ensayo de unión, un ensayo de actividad de FGF o un ensayo de activación de ERK (ver en Ejemplo) con cada polipéptido. Además, uno de evolución temporal y uno de respuesta a la dosis llevados a cabo *in vitro* o *in vivo* (p. ej., mediante el uso de ratones *Fgfr3^{ach/+}* como se describe en la sección de Ejemplos) determinarán las condiciones óptimas para cada polipéptido.

30 Además, cabe señalar adicionalmente que un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la activación funcional del receptor FGFR3 según métodos conocidos. De hecho, dado que el receptor FGFR3 activado se fosforila en residuos tirosina ubicados hacia el dominio citoplasmático, es decir, en Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷, se puede evaluar la activación funcional del receptor FGFR3, por ejemplo, al medir su fosforilación.

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

35 Alternativamente, la fosforilación del receptor en células se puede detectar fácilmente mediante inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo al usar anticuerpos que reconocen específicamente esta modificación. Por ejemplo, la fosforilación de FGFR3 en los residuos Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷ se puede detectar mediante inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo al usar anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra Tyr⁶⁴⁸ y Tyr⁶⁴⁷-FGFR3 fosforilados.

Además, FGFR3, cuando se asocia a su ligando, media la señalización al activar las vías de las cinasas ERK y p38 MAP y la vía de STAT. Por lo tanto, la activación del receptor FGFR3 también se puede evaluar al determinar la activación de estas vías específicas como se describe en Horton et al. (Lancet, 370: 162-172, 2007)

5 En una realización, los polipéptidos de la invención pueden comprender un identificador. Un identificador es una secuencia que contiene un epítipo que puede ser útil para la purificación de los polipéptidos. Se acopla mediante una variedad de técnicas, tales como cromatografía de afinidad, para la localización de dicho péptido o polipéptido dentro de una célula o una muestra de tejido al usar técnicas de inmunoetiquetado, la detección de dicho polipéptido mediante inmunotransferencia, etc. Los ejemplos de identificadores empleados comúnmente en la técnica son el identificador GST (glutación-S-transferasa), el identificador FLAG™, el identificador Strep-tag™, el identificador V5, el identificador myc, el identificador His (que típicamente consiste en seis residuos histidina), etc.

10 En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden comprender modificaciones químicas que mejoran su estabilidad y/o su biodisponibilidad. Dichas modificaciones químicas tienen el objetivo de obtener polipéptidos con mayor protección de los polipéptidos contra la degradación enzimática *in vivo* y/o mayor capacidad para cruzar las barreras membranas y aumentar, por lo tanto, su semivida y mantener o mejorar su actividad biológica. Cualquier modificación química conocida en la técnica se puede emplear según la presente invención. Dichas modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a:

- reemplazo(s) de un aminoácido con un aminoácido modificado y/o inusual, p. ej., un reemplazo de un aminoácido con un aminoácido inusual como Nle, Nva u Orn; y/o
- 20 - modificaciones a los extremos del extremo N y/o el extremo C de los péptidos tal como, p. ej., acilación del extremo N (preferiblemente acetilación) o desaminación, o modificación del grupo carboxilo del extremo C en un grupo amida o alcohol;
- modificaciones a la unión amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el átomo de nitrógeno o el carbono alfa de la unión amida que enlaza dos aminoácidos;
- 25 - modificaciones en el carbono alfa de la unión amida que enlaza dos aminoácidos tales como, p. ej., acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el carbono alfa de la unión amida que enlaza dos aminoácidos.
- cambios de quiralidad tales como, p. ej., reemplazo de uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) con los correspondientes enantiómeros D;
- 30 - retroinversiones en las que uno o más aminoácidos de origen natural (enantiómero L) se reemplazan con los correspondientes enantiómeros D, junto con una inversión de la cadena de aminoácidos (del extremo C al extremo N);
- azapéptidos, en los que uno o más carbonos alfa se reemplazan con átomos de nitrógeno; y/o
- betapéptidos, en los que el grupo amino del uno o más aminoácido se une al carbono β en lugar del carbono α .

En otra realización, agregar dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente circulante en el ojo a través de la barrera hematorretiniana mediante el uso de transportadores endógenos.

35 Otra estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Varios polímeros solubles en agua han demostrado modificar la biodistribución, mejorar el modo de la captación celular, cambiar la permeabilidad a través de las barreras fisiológicas; y modificar la velocidad de aclaramiento desde el cuerpo. Para lograr un efecto de direccionamiento o liberación prolongada, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

40 Se ha usado polietilenglicol (PEG) ampliamente como portador de fármaco, debido a su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. El acoplamiento a varios fármacos, proteínas y liposomas ha demostrado mejorar el tiempo de residencia y disminuir la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el PEG en sí mismo se limita a como máximo dos agentes activos por molécula. En una estrategia diferente, se exploraron copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que conservarían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja agregada de numerosos puntos de acoplamiento por molécula (lo que proporciona mayor carga de fármaco) y que se podrían diseñar sintéticamente para ajustarse a una variedad de aplicaciones.

50 Los expertos en la técnica conocen las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, los polímeros de suministro de fármaco que consisten en polímeros alterantes de PEG y monómeros trifuncionales tales como lisina han sido usados por VectraMed (Plainsboro, N.J.). Las cadenas de PEG (típicamente 2000 daltons o menos) están enlazadas a los grupos amino α - y ϵ de lisina a través de ligaduras de uretano estables. Dichos copolímeros conservan las propiedades deseables de PEG, mientras proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos ácido carboxílico de lisina) en intervalos estrictamente controlados y predeterminadas a lo largo de la cadena

del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden usar para la derivación, reticulación o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables, de larga circulación al variar el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y la ligadura escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta la separación del complejo de fármaco/grupo enlazador y la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos de PEG más pequeños proporcionan mayor carga de fármaco). En general, aumentar el peso molecular global del conjugado de copolímero en bloque aumentará la semivida en circulación del conjugado. Sin embargo, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral que limita la filtración glomerular (p. ej., menos de 60 kDa).

Además, para que la cadena principal del polímero sea importante para mantener la semivida en circulación y la biodistribución, se pueden usar enlazadores para mantener al agente terapéutico en una forma de profármaco hasta su liberación de la cadena principal del polímero mediante un desencadenante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de suministro de fármaco activado por tejido es particularmente útil donde se requiere el suministro a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de la patología. Los expertos en la técnica conocen las bibliotecas de grupo enlazador para su uso en el suministro activado de fármacos y se pueden basar en cinética enzimática, prevalencia de enzima activa y especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionadas. Dichos enlazadores se pueden usar para modificar la proteína o fragmento de la proteína descrito en la presente memoria para el suministro terapéutico.

En todavía otra realización, los polipéptidos de la invención se pueden fusionar con un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido derivado de una proteína no relacionada, por ejemplo, de una proteína inmunoglobulina).

Según se usan en la presente memoria, los términos "fusionado" y "fusión" se usan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión entre sí de dos o más elementos o componentes, mediante cualquier medio incluidos medios de conjugación química y recombinante. Una "fusión dentro del marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) polinucleotídicos para formar un ORF continuo más largo, de tal manera que se mantiene el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. Por ejemplo, una proteína de fusión recombinante puede ser una proteína simple que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no están normalmente unidos de esta forma en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se vuelve, por lo tanto, continuo a través de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados, por ejemplo, por una secuencia enlazador dentro del marco.

Según se usa en la presente memoria, el término "proteína de fusión de sFGFR3" se refiere a un polipéptido que comprende el polipéptido de FGFR3 fusionado con un polipéptido heterólogo. La proteína de fusión de FGFR3 compartirá generalmente al menos una propiedad biológica en común con el polipéptido de FGFR3 (como se describió anteriormente).

Un ejemplo de una proteína de fusión de sFGFR3 es una inmunoadhesina de sFGFR3.

Cabe señalar adicionalmente que un aspecto adicional de la invención se refiere a una inmunoadhesina de sFGFR3 aislada como tal, así como a su uso como fármaco.

Según se usa en la presente memoria, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta de la del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidas IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

La secuencia de inmunoglobulina es preferiblemente, pero no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las propiedades químicas y biológicas valiosas de los anticuerpos humanos. Dado que las inmunoadhesinas se pueden construir a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada enlazada con una secuencia de dominio constante (Fc) y bisagra de inmunoglobulina humana, la especificidad de unión de interés se puede obtener al usar componentes completamente humanos. Dichas inmunoadhesinas son mínimamente inmunógenas para el paciente, y son seguras para su uso crónico o repetido. En una realización, la región Fc es una región Fc de secuencia natural. En otra realización, la región Fc es una región Fc variante. En todavía otra realización, la región Fc es una región Fc funcional. La porción de sFGFR3 y la porción de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina de sFGFR3 se pueden enlazar mediante un enlazador mínimo. La secuencia de inmunoglobulina es preferiblemente, pero no necesariamente, un dominio constante de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención se puede obtener a partir de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente IgG1 o IgG3.

Según se usa en la presente memoria, el término "región Fc" se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluidas regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente por extenderse desde un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxílico de esta.

Otro ejemplo de una proteína de fusión de sFGFR3 es una fusión del polipéptido de sFGFR3 con anticuerpos de dominio de unión a seroalbúmina humanos (AlbudAbs) según la AlbudAb™ Technology Platform como se describe en Konterman et al. 2012 AlbudAb™ Technology Platform-Versatile Albumin Binding Domains for the Development of Therapeutics with Tunable Half-Lives

Como será evidente para los expertos en la técnica, los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante cualesquiera medios adecuados. Para producir cantidades suficientes de un sFGFR3 o equivalentes funcionales de este, o una proteína de fusión de sFGFR3, tal como una inmunoadhesina de sFGFR3 para su uso según la invención, se puede obtener de manera conveniente la expresión al cultivar células hospedantes recombinantes que contienen el polipéptido de la invención en condiciones adecuadas. Preferiblemente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, por expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y la expresión de un polipéptido en una variedad de células hospedantes diferentes se conocen.

Cuando se expresa de forma recombinante, el polipéptido se genera, preferiblemente, por expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula hospedante. Se puede usar cualquier célula hospedante, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema particular. Las células hospedantes adecuadas incluyen células de bacterias, mamíferos, células vegetales, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino. Células HeLa, células de riñón de hámster bebé y muchas otras (p. ej., células HEK 293). Las bacterias constituyen también hospedantes preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con que las bacterias se pueden manipular y multiplicar. Un hospedante bacteriano común preferido es *E. coli*.

Además, cabe señalar que la mayoría de las sustancias biofarmacéuticas basadas en proteínas tiene alguna forma de modificación posterior a la traducción que puede afectar de manera profunda las propiedades de la proteína relevantes para su aplicación terapéutica. La glicosilación proteica representa la modificación más común (aproximadamente el 50 % de las proteínas humanas están glicosiladas). La glicosilación puede introducir una heterogeneidad considerable en una composición proteica a través de la generación de diferentes estructuras de glicanos en las proteínas dentro de la composición. Dichas estructuras de glicano se producen por la acción de diversas enzimas de la maquinaria de glicosilación a medida que la glicoproteína transita por el retículo endoplasmático (ER, por sus siglas en inglés) y el aparato de Golgi (cascada de glicosilación). La naturaleza de la(s) estructura(s) del glicano de una proteína influye sobre el plegado, estabilidad, tiempo de vida, tránsito, farmacodinámica, farmacocinética e inmunogenicidad de la proteína. La estructura del glicano tiene un gran impacto sobre la actividad funcional primaria de la proteína. La glicosilación puede afectar la estructura proteica local y puede ayudar a dirigir el plegado de la cadena polipeptídica. Un tipo importante de estructuras de glicano son los llamados N-glicanos. Se generan por ligadura covalente de un oligosacárido al grupo amino (N) de residuos asparagina en la secuencia consenso NXS/T de la cadena polipeptídica emergente. Los N-glicanos pueden participar adicionalmente en la clasificación o direccionamiento de una proteína hacia su diana final: el N-glicano de un anticuerpo, por ejemplo, puede interactuar con componentes de complemento. Los N-glicanos también sirven para estabilizar una glicoproteína, por ejemplo, al potenciar su solubilidad, al proteger parches hidrófobos en su superficie, protegerla de la proteólisis y dirigir interacciones estabilizantes intracadena. La glicosilación puede regular la semivida de la proteína, por ejemplo, en humanos la presencia de ácidos siálicos terminales en N-glicanos puede aumentar la semivida de proteínas que circulan en el torrente sanguíneo.

Según se usa en la presente memoria, el término "glicoproteína" se refiere a cualquier proteína que tiene uno o más N-glicanos acoplados a ella. Por lo tanto, el término se refiere tanto a proteínas que se reconocen generalmente en la técnica como una glicoproteína como a proteínas que han sido genéticamente manipuladas para contener uno o más sitios de glicosilación enlazados a N. Según se usan en la presente memoria, los términos "N-glicano" y "glicofoma" se usan de manera intercambiable y hacen referencia a un oligosacárido enlazado a N, por ejemplo, uno que se acopla mediante una ligadura asparagina-N- acetilglucosamina a un residuo asparagina de un polipéptido. Las glicoproteínas enlazadas a N contienen un residuo N-acetilglucosamina enlazada al nitrógeno amida de un residuo asparagina en la proteína. Los azúcares predominantes encontrados en glicoproteínas son glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico (p. ej., ácido N-acetil-neuramínico (NANA, por sus siglas en inglés)). El procesamiento de los grupos azúcar se produce concomitantemente con la traducción en la luz del ER y continúa después de la traducción en el aparato de Golgi para glicoproteínas enlazadas a N.

Recientemente se implementó el desarrollo de varias levaduras, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* para usar las ventajas de dichos sistemas, pero para eliminar las desventajas en relación con la glicosilación. Varias cepas están en desarrollo genético para producir estructuras de glicano definidas, similares a las humanas, en una proteína. Los métodos para manipular genéticamente levadura para producir N-glicanos similares a los humanos se describen en la patente estadounidense núms. 7.029.872 y 7.449.308 junto con métodos descritos en la solicitud estadounidense publicada núms. 20040230042, 20050208617, 20040171826, 20050208617

- y 20060286637. Estos métodos se han usado para construir levadura recombinante que puede producir glicoproteínas terapéuticas que tienen un complejo predominantemente similar al humano o N-glicanos híbridos en ellas en lugar de N-glicanos del tipo de levadura. Como se describió anteriormente, la glicosilación similar a la humana se caracteriza principalmente por estructuras de N-glicano "complejas" que contienen N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y/o ácido N-acetilneuramínico. Por lo tanto, se han manipulado genéticamente varias cepas de levaduras para producir glicoproteínas que comprenden uno o más N-glicanos complejos similares a los humanos o híbridos similares a los humanos tales como GlcNAcMan3GlcNAc2.
- Según se usa en la presente memoria, el término "trastorno de retraso del crecimiento esquelético" se refiere a una enfermedad esquelética caracterizada por deformidades y/o anomalías de los huesos.
- Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastornos de retraso del crecimiento esquelético causados por fracturas de la placa de crecimiento (fisaria), trastornos de retraso del crecimiento esquelético idiopático y enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3.
- Según se usa en la presente memoria, el término "trastorno de retraso del crecimiento esquelético idiopático" se refiere a una enfermedad esquelética cuya causa es desconocida y para la cual el tratamiento con hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) exógena, p. ej., GH humana recombinante (rhGH, por sus siglas en inglés), por ejemplo, ha demostrado ser ineficaz.
- En el contexto de la presente invención, se pretende que el término "enfermedad esquelética relacionada con FGFR3" signifique una enfermedad esquelética que es causada por la activación anormal aumentada de FGFR3, en particular, por la expresión de un mutante de ganancia funcional del receptor FGFR3. Según se usan en la presente memoria, las expresiones "variante de receptor FGFR3 de ganancia funcional", "mutante de ganancia funcional de FGFR3" o "mutante de FGFR3 que exhibe una actividad prolongada" se usan de manera intercambiable y hacen referencia a un mutante de dicho receptor que exhibe una actividad biológica (es decir, que desencadena señalización posterior) que es más alta que la actividad biológica del receptor natural correspondiente en presencia de un ligando FGF.
- Las enfermedades esqueléticas relacionadas con FGFR3 son preferiblemente displasias genéticas relacionadas con FGFR3 y craneosinostosis relacionadas con FGFR3.
- Las displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3 según la invención pueden corresponder a una enfermedad heredad o esporádica.
- Según se usa en la presente memoria, el término "displasias esqueléticas relacionadas con FGFR3" incluye, pero no se limita a, displasia tanatofórica tipo I, displasia tanatofórica tipo II, hipocondroplasia, acondroplasia y SADDAN (acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria).
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es causada por la expresión en el sujeto de una variante del receptor FGFR3 de ganancia funcional tal como se definió anteriormente.
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una acondroplasia causada por la expresión del mutante de ganancia funcional G380R del receptor FGFR3.
- Alternativamente, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una acondroplasia causada por la expresión de G375C, G346E o S279C del receptor FGFR3.
- Cabe señalar, además, que también se abarca la acondroplasia causada por otro mutante del receptor FGFR3 identificado en el futuro.
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una hipocondroplasia causada por la expresión del mutante de ganancia funcional N540K, K650N, K650Q, S84L, R200C, N262H, G268C, Y278C, V381E del receptor FGFR3.
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica tipo I causada por la expresión de un mutante de ganancia funcional del receptor FGFR3 elegido del grupo que consiste en los receptores FGFR3 R248C, S248C, G370C, S371C; Y373C, X807R, X807C, X807G, X807S, X807W y K650M.
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una displasia tanatofórica tipo II causada por la expresión del mutante de ganancia funcional K650E del receptor FGFR3.
- En una realización preferida, la displasia esquelética relacionada con FGFR3 es una acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria causada por la expresión del mutante de ganancia funcional K650M del receptor FGFR3.
- El uso del polipéptido de sFGFR3 aislado según la presente invención para prevenir o tratar una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de FGFR3 soluble (sFGFR3) a un sujeto que lo necesita.

Se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" de un sFGFR3, como se describió anteriormente, una cantidad suficiente del antagonista para prevenir o tratar una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 (p. ej. acondroplasia). Se entenderá, sin embargo, que el médico tratante decidirá el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención dentro del alcance del juicio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se va a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneamente con el polipéptido específico empleado; y factores similares conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está dentro del conocimiento de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles más bajos que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar dentro de un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que se va a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente, de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra habitualmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Según se usa en la presente memoria, el término "sujeto" denota un mamífero humano o no humano, tal como un roedor, un felino, un canino, un equino o un primate. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, más preferiblemente, un niño (es decir, un niño que está creciendo).

Deberá recordarse que la matriz cartilaginosa de la placa de crecimiento es menos densa en un recién nacido o en un niño que en un adulto. Por lo tanto, sin ánimo de limitarse a la teoría, se espera que el polipéptido de la invención penetre mejor dicha matriz cartilaginosa en un recién nacido o un niño.

En una realización, se ha diagnosticado que el sujeto padece una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3. Como se describió anteriormente, la enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 es causada por la expresión en el sujeto de una variante del receptor FGFR3 constitutivamente activo tal como el mutante constitutivamente activo G380R.

En el contexto de la invención, el término "tratar" se usa en la presente memoria para caracterizar un método o proceso terapéutico que tiene como objetivo (1) enlentecer o detener la progresión, agravamiento o deterior de los síntomas del estado de enfermedad o afección al cual se aplica dicho término; (2) aliviar o producir mejoras en los síntomas del estado de enfermedad o afección al cual se aplica dicho término; y/o (3) revertir o curar el estado de enfermedad o afección al cual se aplica dicho término.

Según se usa en la presente memoria, el término "prevenir" pretende caracterizar un método o proceso profiláctico que tiene el objetivo de retrasar o prevenir la aparición de un trastorno o afección al cual se aplica dicho término.

Composiciones farmacéuticas de la invención:

El polipéptido de FGFR3 soluble (sFGFR3) aislado, según se describió anteriormente, se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación prolongada, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de sFGFR3 aislado según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 que comprende un polipéptido de sFGFR3 según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inadecuada cuando se administra a un mamífero, especialmente un humano, según sea adecuado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxico, sólido, semisólido o líquido.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptable para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden ser, en particular, disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o

secos, especialmente composiciones liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

- Las dosis usadas para la administración se pueden adaptar como una función de diversos parámetros y, en particular, como una función del modo de administración usado, de la patología relevante o, alternativamente, la duración del tratamiento deseada. Por ejemplo, está dentro del conocimiento de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles más bajos que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos se puede variar dentro de un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que se va a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente, de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra habitualmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.
- Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz de un polipéptido según la invención se puede disolver o dispersar en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista un uso fácil con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deberá conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de estos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

- Los polipéptidos según la invención se pueden formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- El portador puede ser también un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede lograr la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- Las disoluciones inyectables estériles se preparan al incorporar los compuestos activos en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes indicados anteriormente, según sean necesarios, y posterior esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril, que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de aquellos indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de estos.

- La preparación de disoluciones más o altamente concentradas para inyección directa también se contempla, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar lugar a una penetración extremadamente rápida, que suministra concentraciones altas de los agentes activos a un área de tumor pequeña.

- Después de la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se puede tamponar de manera adecuada y que el diluyente líquido primero se vuelva isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas

disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que se pueden emplear en virtud de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y agregarse a 1000 ml de fluido de hipodermóclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15a edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto al que se va a tratar. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 que comprende un polipéptido de sFGFR3 aislado según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

El uso comprende una etapa de administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de sFGFR3 y un portador farmacéuticamente aceptable a un sujeto que lo necesita.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: Unión a FGF eficaz y fosforilación reducida de Erk en células ATDC5 en presencia de FLAG-sFGFR3. (A) Se incubaron cantidades fijas de FGF básico humano o murino (100 ng) con concentraciones crecientes de FLAG-sFGFR3. Después de 2 h, se detectaron FGF no unidos restantes mediante ELISA. El análisis de regresión lineal no mostró ninguna diferencia estadística entre las dos pendientes. hFGF, FGFb humano; mFGF, FGFb de ratón. El experimento se llevó a cabo por triplicado y se repitió cinco veces. (B) La fosforilación de Erk se evaluó mediante inmunotransferencia en células ATDC5 después de la incubación con dosis crecientes de FLAG-sFGFR3. El gráfico representa las variaciones de fosforilación en porcentaje en comparación con los niveles de fosforilación en células no tratadas. Los experimentos se repitieron seis veces. Después de la verificación de la normalidad, se llevaron a cabo las comparaciones estadísticas al usar ANOVA de una sola vía. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Los valores representan la media \pm DT.

Figura 2: Efecto del tratamiento con FLAG-sFGFR3 sobre el crecimiento esquelético global. (A) Radiografías con rayos X que ilustra el efecto del tratamiento sobre el crecimiento esquelético. Los esqueletos que se muestran son representativos de ratones wt y *Fgfr3^{ach/+}* que recibieron inyección subcutánea de PBS o 5 ng de FLAG-sFGFR3. El crecimiento se caracterizó por mediciones del peso corporal (B), longitud corporal y de la cola (C) y huesos largos (D). (Los datos exhibieron distribución normal; se usó una prueba de la t de Student para comparar datos con mediciones obtenidas en ratones no tratados. *n* por grupo se muestran en la Tabla 1; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ con respecto a ratones wt no tratados; ### $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ con respecto a ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados. wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*).

Figura 3: Efecto del tratamiento con FLAG-sFGFR3 sobre la maduración de las vértebras. (A) El índice de cifosis (KI, por sus siglas en inglés) se midió a partir de radiografías de ratones posicionados en decúbito lateral derecho. Se lo definido por Laws *et al.* (28), la línea AB es la longitud de una línea que se extiende desde el borde posterior de C7 hasta el borde posterior de L6. La línea CD es la distancia desde la línea AB hasta el borde dorsal del cuerpo vertebral más alejado de dicha línea. Clínicamente, una cifosis se caracteriza con $KI < 4$. (B) Fotografías de vértebras representativas de ratones wt no tratados, ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados y ratones transgénicos que recibieron 5 ng de FLAG-sFGFR3. En la tabla se indica el porcentaje de animales en los diferentes grupos de tratamiento con vértebras C7, T11 y lumbares inmaduras. §Las compresiones lumbares se caracterizaron por paraplejía o falta de locomoción. Los datos tuvieron la distribución normal; se usó la prueba de la t de Student para comparar datos con mediciones obtenidas en ratones no tratados. *n* por grupo se muestran en la Tabla 1; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ con respecto a ratones wt no tratados; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ con respecto a ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados. wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*).

Figura 4: Efectos del tratamiento con FLAG-sFGFR3 sobre el desarrollo del cráneo. Se midieron la (A) longitud (L) y el ancho (W) del cráneo y se calculó la relación L/W. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso de una prueba de la t de Student después de la verificación de la varianza y distribución normales. *n* por grupo se muestran en la Tabla 1; $p < 0,001$ con respecto wt no tratados; $p < 0,05$ con respecto a ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados. (B) Radiografías representativas de cráneos de ratones wt y *Fgfr3^{ach/+}* que recibieron PBS o 5 ng de FLAG-sFGFR3. Muestran la prevención por el tratamiento del cierre prematuro de la sincondrosis craneal típicamente observada en ratones *Fgfr3^{ach/+}*. Esto se indica mediante la punta de flecha. wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

Ejemplo:

Material y métodos

Subclonación de sFGFR3 y producción de proteína recombinante: Para facilitar la subclonación, se optimizó la secuencia de ADNc de longitud completa que codifica FGFR3 Δ TM (2,1 kb) (35), un generoso obsequio de Dr.

Kurokawa-Seo, Kyoto Sangyo University, Japón, para disminuir el contenido de GC mientras codifica la secuencia de la proteína original (proceso GeneOptimizer®, GeneArt). El fragmento sintetizado se subclonó en pFLAG-CMV3_G727 (Sigma Aldrich) al usar los sitios de clonación HindIII y KpnI. El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía con UV. La construcción final se verificó mediante secuenciación. La homología de secuencia dentro de los sitios de restricción usados fue de 100 %.

Se produjo la proteína FLAG-sFGFR3 recombinante mediante transfección transitoria al usar el reactivo de transfección GeneJuice (Merck Millipore) en células HEK 293 que posibilitan todas las modificaciones posteriores a la traducción necesarias. Cada transfección se llevó a cabo en una fábrica de células (matraz High T600, Merck Millipore) con 80 % de HEK 293 confluentes en 100 ml de DMEM sin rojo de fenol (Gibco, Life Technologies) complementado con glutamina 2 mM (Gibco, Life Technologies) y antibióticos al 1 % (Gibco, Life Technologies). Se resuspendieron 600 µl de GeneJuice y 240 µg de pFLAG-sFGFR3 en 30 ml de OptiMEM (Gibco, Life Technologies), se incubaron 30 min a temperatura ambiente y después se incubaron durante 4 h sobre las células a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después, el medio se reemplazó por 120 ml de DMEM sin rojo de fenol, complementado con glutamina 2 mM y antibióticos al 1 %. Después de 72 h, el medio de producción se filtró al usar filtros de 0,22 µm y se concentró en Amicon Ultra-15 60kDa (Merck Millipore). La proteína recombinante después se purificó en una columna de afinidad (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Las cantidades de FLAG-sFGFR3 se midieron mediante ELISA específico (R&D Sistemas) según las instrucciones del fabricante. A continuación, FLAG-sFGFR3 se almacenó a una concentración de 0,5 µg/ml en disolución de glicerol al 50 %.

Incubación de FLAG-sFGFR3 con FGF: Se incubaron cantidades fijas de FGF humanos o murinos (100 pg) (R&D Systems) durante 2 h a 37 °C con dosis crecientes de FLAG-sFGFR3 (0 a 250 ng/ml) en PBS con BSA al 1 %. Se usaron kits de ELISA comerciales específicos (R&D Systems) para cuantificar los FGF no unidos restantes. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se repitieron cinco veces.

Semivida de sFGFR3: Para determinar la semivida de sFGFR3, ratones WT de 8 semanas recibieron un bolo intravenoso de 50 mg/kg de FLAG-sFGFR3. Se recogió sangre a los 15 min, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h mediante punción retroorbital al usar un catéter con heparina (n = 4). La concentración de FLAG-sFGFR3 mediante ELISA anti FLAG (Sigma). La semivida de la fase terminal se calculó al usar la siguiente ecuación farmacocinética $t_{1/2} = 0,693/\lambda_z$, donde 0,693 es el logaritmo natural de 2 y λ_z , la pendiente de la fase terminal.

Análisis de inmunotransferencia: La inmunotransferencia se llevó a cabo después de la incubación de varias dosis de FLAG-sFGFR3 en células ATDC5. Con este fin, se colocaron en placas células ATDC5 a una densidad de 2×10^6 en placas de 6 pocillos y, después de la adhesión, se cultivaron durante 48 h en BSA al 0,5 % en DMEM-F12 (Gibco, Life Technologies) que contenía antibióticos al 1 %. A continuación, las células se cultivaron durante 10 min con 100 pg/ml de FGF murino preincubado durante 2 h a 37 °C con dosis crecientes de FLAG-sFGFR3 (0, 12,5, 125, 1250, 12500 pg/ml). Al final del período de incubación, los FGF no unidos restantes se midieron mediante ELISA específico (R&D Sistemas). A continuación, las células se solubilizaron en tampón de lisis (TRIS 20 mM, pH 7,4, NaCl 150, EDTA 10 mM, NaF 150 mM, ortovanadato de sodio 2mM, pirofosfato 10 mM, inhibidores de proteasa y Triton X-100 al 1 %) durante 45 min a 4 °C. Los lisados se aclararon (14 000 rpm, 10 min) y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirieron como se describió anteriormente (36). Las proteínas se sondearon con anticuerpos (1 µg/ml) anti-p42/44 MAPK fosfo (4370S, Cell Signaling), anti-p42/44 MAPK total (4696S, Cell Signaling) y anti-hsp60 (sc1722, Santa Cruz Biotechnology). Todos los experimentos se llevaron a cabo seis veces.

Inmunohistoquímica de FLAG-sFGFR3: La inmunohistoquímica de FLAG-sFGFR3 se llevó a cabo en tibias de ratones *Fgfr3^{ach/+}* de 3 días y sus compañeros de camada naturales. Con este fin, después de la decapitación de los ratones recién nacidos, se recogieron cuidadosamente las tibias y se incubaron en placas de 24 pocillos en presencia de 5 ng de FLAG-sFGFR3 durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. A continuación, las tibias se enjugaron en PBS y se fijaron en formalina al 10 % durante 24 h. Después de la descalcificación en EDTA durante 2 días, los huesos se embebieron en parafina y se incubaron secciones de 5 µm con 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2-FITC (Sigma Aldrich). Las secciones se contratiñeron con disolución Hoechst y se visualizaron con microscopía fluorescente. Se usó un anticuerpo anti-IgG como testigo negativo.

Animales y tratamientos: En todo momento se siguieron The Principles of Laboratory Animal Care (publicación de NIH núm. 85-23, revisados en 1985; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>) y las pautas de la Comisión Europea para la protección de los animales usados con fines científicos (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Institutional Ethic Committee para el uso de animales de laboratorio (CIEPAL Azur) (núm. de aprobación NCE-2012-52).

Los experimentos se llevaron a cabo en animales transgénicos *Fgfr3^{ach/+}* en los que la expresión del FGFR3 mutante es impulsada por el promotor/potenciador Col2a1 (22). Los ratones se expusieron a un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y tuvieron acceso libre a alimento y agua de laboratorio estándares. Todas las mediciones y análisis se llevaron a cabo con enmascaramiento y los genotipos se analizaron después de que todos los análisis se llevaron a cabo mediante PCR del ADN genómico que amplifica 360 bp del transgén de FGFR3 (22). Se evaluaron dos dosis de FLAG-sFGFR3 (0,5 ng y 5 ng en 10 µl de PBS con glicerol al 50 %). El día 3, todos los ratones recién nacidos de una única camada recibieron la misma dosis. Las camadas testigo recibieron 10 µl de PBS que contenía glicerol al 50 %. A continuación,

- se suministraron inyecciones subcutáneas dos veces por semana durante tres semanas, alternativamente en el lado izquierdo y derecho del lomo. Los ratones se observaron a diario con atención particular a alteraciones en la locomoción y la micción. El día 22, todos los animales se sacrificaron excepto dos camadas por grupo mediante asfixia por CO₂; se determinaron el género y los genotipos. Se midieron los pesos corporales. Se recogió la sangre mediante punción cardíaca y se mezcló con 50 µl de EDTA 0,5M; la mitad de las muestras se centrifugaron para una evaluación bioquímica mediante el uso de un Beckman AU 2700 Analyzer (electrolitos (Na⁺, K⁺, Cl⁻), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol, creatinina, creatinina cinasa (CK, por sus siglas en inglés), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), amilasa, bilirrubina total (BLT, por sus siglas en inglés)); la otra mitad se analizó sin centrifugación para numeración sanguínea (Hemavet 950FS, Mascot Hematology). Los cadáveres se despellejaron y evisceraron cuidadosamente y se obtuvieron mediciones esqueléticas (longitudes del cuerpo y cola) al usar un calibre digital electrónico (Fisher Scientific). La longitud corporal total se midió desde la nariz hasta el extremo de la última vértebra caudal; la cola se midió desde la primera vértebra caudal. Los órganos (corazón, pulmones, hígado, riñones, bazo) se recogieron, pesaron y almacenaron en formalina al 10 % para análisis histológico adicional mediante el uso de técnicas de incrustación en parafina estándares. Se tomaron radiografías de todos los esqueletos mediante el uso de una máquina de rayos X Faxitron (Edimex). Mediante el uso de un método establecido (28), se midió el índice cífótico para cada uno de los animales en las radiografías. Los esqueletos aclarados después se tiñeron simultáneamente con azul alcian y rojo de alizarina al usar procedimientos estándares y se almacenaron en glicerol antes del análisis. Los huesos largos teñidos (tibias, fémures, húmeros) se disecaron y midieron al usar un calibre digital electrónico; las vértebras y cráneos también se disecaron y analizaron.
- La reproducción se fijó para generar teóricamente camadas con mitad ratones naturales y mitad heterocigóticos para *Fgfr3^{gach/+}*. Para evitar sesgo debido a variaciones de penetrancia de fenotipo, los experimentos se llevaron a cabo en al menos 2 camadas (una tratada y una testigo) que surgieron de los mismos criadores. Se trataron un total de 15, 9 y 11 camadas que representan un total de 312 crías con PBS, 0,5 ng o 5 ng de FLAG-sFGFR3, respectivamente. Los n por grupo se presentan en la Tabla 1.
- Efecto de FLAG-sFGFR3 sobre la fertilidad de los animales tratados: Los animales de las camadas que no se usaron para mediciones esqueléticas se mantuvieron hasta que alcanzaron edad reproductiva. Con 8 semanas, después se aparearon con ratones FVB/N de 8 semanas de Charles River. Los ratones recién nacidos se contaron en el nacimiento para cada macho y hembra tratado y testigo y se compararon con estadísticas de fertilidad de la generación anterior. Con 22, las crías se sacrificaron y se evaluó el crecimiento como se describió anteriormente.
- Ensayos de proliferación y diferenciación: el efecto de sFGFR3 sobre la proliferación se determinó en células ATDC5. Con este fin, se colocaron en placas células ATDC5 a una densidad de 5x10⁴ en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 48 h en DMEM-F12 con BSA al 0,5 % (Life Technologies). Las células después se expusieron durante 72 h con 100 pg/ml de FGF2, FGF9 o FGF18 en presencia de 0 o 20 ng/ml de FLAG-sFGFR3. La proliferación se evaluó al usar el ensayo de proliferación MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) mediante la medición de la absorbancia a 540 nm.
- Para determinar el efecto del tratamiento sobre la diferenciación de los condrocitos, se incubaron células ATDC5 subconfluentes en placas de 24 pocillos durante 7 días en medio (37,5 µg/ml de L-ácido ascórbico; piruvato de sodio 1 mM; insulina-transferrina-sodio selenita al 1 %; dexametasona 100 nM en DMEM F12) en presencia de 100 pg/ml de FGF y 0 o 20 ng/ml de FLAG-sFGFR3. Después de 7 días en cultivo, la mitad de los pocillos se tiñeron con azul alcian, pH 2,5, en ácido acético al 3 %. En los pocillos restantes, se extrajo el ARN total al usar un kit RNeasy Mini (Qiagen). El ARN total (1 µg) se transcribió a la inversa y se llevó a cabo PCR en tiempo real (ABI PRISM 7500). Los ensayos de expresión génica TaqMan se adquirieron a Applied Biosystems: *Col10a1* (Mm00487041_m1), *Col2a1* (Mm01309565_m1), *Sox9* (Mm00448840_m1), *Fgfr3* (Mm004332_94_m1), *RPLP0* (fosfoproteína ribosómica grande P0, Mm00725448_s1). Los valores de la expresión génica se normalizaron con respecto al valores de expresión del gen de mantenimiento *RPLP0* y se calcularon en función del método Ct de umbral de ciclo comparativo (2^{-ΔCt}) como se describió anteriormente.
- Análisis estadístico: Todos los experimentos y las mediciones de datos fueron llevados a cabo por experimentadores sometidos a enmascaramiento en todo momento. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa informático GraphPad Prism 6.0. Para determinar las pruebas estadísticas a usar, se verificaron los supuestos necesarios. Para verificar la normalidad y varianza igual, se llevaron a cabo una prueba de normalidad general de Agostino y Pearson y una prueba de Brown-Forsythe, respectivamente. Debido a que todos los conjuntos de datos de mediciones esqueléticas cumplieron los requisitos de normalidad y varianza igual, se usó una prueba de la *t* de Student bilateral para comparaciones de dos grupos independientes en los diferentes análisis estadísticos. La comparación de datos de mortalidad entre los grupos tratados y testigo se hizo mediante el uso de una prueba de Kruskal-Wallis. La comparación de la unión de FLAG-sFGFR3 a FGF humanos y murinos se hizo mediante regresión lineal. La distribución de los datos de inmunotransferencia exhibió normalidad y, por lo tanto, se analizaron mediante el uso de un ANOVA unidireccional al usar una prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. Para los análisis de la correlación del peso de los órganos, se usaron pruebas de Pearson o Spearman cuando los conjuntos de datos exhibieron o no una distribución normal, respectivamente. Todas las pruebas estadísticas se consideraron significativa a un nivel *p*<0,05 de error. En todas las figuras, los valores de *p* se muestran de la siguiente manera: **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001. Los datos se presentan como medias ± DT.

Resultados

FLAG-sFGFR3 se une de manera eficaz a FGF y disminuye la señalización de MAPK en células ATDC5: Se produjo una forma soluble de FGFR3 mediante transfección transitoria de un plásmido que codifica la secuencia FGFR3 Δ TM. Para detectar FGFR3 soluble recombinante *in vivo*, los inventores usaron una forma soluble de FGFR3 etiquetada con un identificador FLAG. Este identificador se usó debido a la disponibilidad de reactivos para su purificación y su detección (23, 24). Además, ya se ha usado *in vivo* sin inducir eliminación prematura de la proteína identificada por el sistema inmunitario (25, 26). En los presentes experimentos, se produjo FLAG-sFGFR3 recombinante mediante transfección transitoria en células de riñón embrionario humano (HEK, por sus siglas en inglés) 293, que posibilitan todas las modificaciones posteriores a la traducción necesarias, se purificaron al usar columna de afinidad y se almacenaron a una concentración de 0,5 μ g/ml en glicerol al 50 %. En ratones, la semivida de sFGFR3 es de 16 horas.

Para verificar que FLAG-sFGFR3 se une de manera eficaz a FGF libres, se incubaron cantidades fijas de FGF humanos con cantidades crecientes de FLAG-sFGFR3. Como se observa en la Figura 1A, FLAG-sFGFR3 se unió de manera eficaz a hFGF de manera dependiente de la dosis. La secuencia de FGFR3 Δ TM usada es de origen humano, los inventores verificaron que también podría unirse a FGF murino. Se obtuvieron resultados similares y FLAG-sFGFR3 fue capaz de unirse a cantidades similares de FGF murinos. Esto se esperaba dado que hay un 90 % de homología de secuencia entre el FGFR3 murino y humano. El sFGFR3 compitió por la unión a hFGF con FGFR3 endógeno en condrocitos murinos (células ATDC5), lo que demuestra el mecanismo de receptor señuelo.

A continuación, los inventores verificaron que la formación de complejos de FGF con FLAG-sFGFR3 generaba una disminución de la señalización de FGF intracelular en la fosforilación de Erk. Se usaron células ATDC5 como una línea celular de condrocitos murinos para estudiar la biología de los condrocitos (27). Como se observa en la Figura 1B, se observó una disminución significativa en la fosforilación de Erk en relación con la dosis de FLAG-sFGFR3. Esto se correlacionó con una disminución de FGF libres en el medio acondicionado, similar a la observada en la Figura 1A. Estos resultados demuestran que FLAG-sFGFR3 se une de manera eficaz a FGF de origen humano y murino y, por lo tanto, disminuye la señalización intracelular de FGF. El tratamiento con sFGFR3 también restauró la proliferación y diferenciación de células ATDC5 de ratón y aumentó significativamente la expresión génica de *colágeno tipo 2*, *colágeno tipo 10* y *Sox 9* con respecto a FGF solo ($P < 0,05$, prueba de la t de Student). No se observó ningún efecto sobre la proliferación, diferenciación o expresión génica en presencia de la proteína testigo.

También se exploraron mecanismos independientes de FGF. No se fosforiló Stat1 en condrocitos *Fgfr3^{ach/+}* tratados con sFGFR3. Además, la expresión génica *fgfr3* no se alteró en los testigos con solo FGF mediante el tratamiento con sFGFR3 en condrocitos aislados de animales *Fgfr3^{ach/+}*. Juntos, estos datos sugieren que los efectos de sFGFR3 son mediados solo a través de vías dependientes de FGF.

El FGFR3 soluble aumenta la supervivencia de ratones *Fgfr3^{ach/+}* y restaura de manera eficaz el crecimiento óseo en ratones *Fgfr3^{ach/+}*: Antes de evaluar el efecto de tratamiento con FLAG-sFGFR3 *in vivo*, los inventores verificaron si podría penetrar la matriz cartilaginosa densa de la placa de crecimiento y llegar a los condrocitos diana. Se incubaron huesos largos aislados de ratones *Fgfr3^{ach/+}* de tres días y sus compañeros de camada naturales (wt) durante 24 h en presencia de 5 ng de FLAG-sFGFR3. Como se observa en la Figura 2, la proteína recombinante se detectó dentro de la matriz, cerca de los condrocitos de la placa de crecimiento tibial de ratones wt y *Fgfr3^{ach/+}*, lo que muestra que la proteína penetra de manera eficaz la matriz cartilaginosa densa de la placa de crecimiento y llega a los condrocitos diana.

Para evaluar los efectos biológicos del tratamiento con FLAG-sFGFR3 sobre el crecimiento óseo esquelético en ratones *Fgfr3^{ach/+}*, todos los ratones recién nacidos de una camada recibieron el mismo tratamiento sin conocer su fenotipo. Recibieron una inyección subcutánea de 0,5 o 5 ng de FLAG-sFGFR3, o PBS en los grupos testigo, dos veces por semana durante 3 semanas. La primera observación fue la reducción significativa en la mortalidad en las camadas tratadas en comparación con las no tratadas. Al finalizar el período de tratamiento, los grupos testigo contenían aproximadamente un tercio de animales transgénicos vivos, mientras que en ambos grupos tratados había aproximadamente 50 % de ratones wt y 50 % de *Fgfr3^{ach/+}* (Tabla 1). Además, en las camadas testigo, el 31 % de los animales murió antes del fin de los experimentos en comparación con 11,8 % y 6,7 % en las camadas tratadas con 0,5 ng y 5 ng de FLAG-sFGFR3, respectivamente. Esta reducción en el tamaño del grupo se debió a la muerte prematura o eutanasia de animales parapléjicos. Cuando fue posible, se llevó a cabo una autopsia y se confirmó la muerte por falla respiratoria como se observa por la presencia de sangre dentro de los pulmones. Dos animales murieron como consecuencia de una obstrucción intestinal. Todos estos animales fueron *Fgfr3^{ach/+}*, según se confirmó por genotipificación. Ningún animal natural murió prematuramente. Cabe hacer énfasis en que en el grupo testigo, la mayoría de los ratones *Fgfr3^{ach/+}* afectados murió por falla respiratoria, mientras que en el grupo de tratamiento con 5 ng de FLAG-sFGFR3, la mayoría padeció paraplejia y solo unos pocos tuvieron problemas respiratorios (Tabla 1). En general, estos datos indican que con el tratamiento menos animales murieron y que aquellos que murieron tenía un fenotipo menos grave.

Tabla 1: Número de crías en los diferentes grupos de tratamiento el día 3 y el día 22.

Las camadas se consideraron entidades únicas y todos los ratones recién nacidos de la misma jaula recibieron el mismo tratamiento. Los animales vivos y muertos se contaron a diario. La autopsia reveló muerte por falla respiratoria

y obstrucción intestinal para 2 animales. Los animales con paraplejia se sometieron a eutanasia después del hallazgo y de registraron en el grupo de animales muertos. Todos los animales muertos fueron *Fgfr3^{ach/+}*. La comparación estadística con respecto al grupo testigo se hizo al usar la prueba de Kruskal-Wallis. ***p*<0,01. wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

	Cantidad de camadas por grupo	Cantidad de crías		% de animales muertos antes del día 22 (causa de muerte)
		Día 3	Día 22	
PBS	15	132	91 (wt: 67; ach: 24)	31 % (23 por falla respiratoria, 2 por oclusión intestinal, 16 por paraplejia)
0,5 ng sFGFR3	9	76	67 (wt: 31; ach: 36)	11,8 % ** (4 por falla respiratoria, 5 por paraplejia)
5 ng sFGFR3	11	104	97 (wt: 47; ach: 50)	6,7 % ** (1 por falla respiratoria, 6 por paraplejia)

5

El día 22, en el momento del destete, los animales se sacrificaron y se evaluó su crecimiento. Los inventores primero confirmaron que no había una diferencia estadística entre los machos y hembras (Tabla S1) y los reagruparon para todos los análisis posteriores. Como se ilustra en la Figura 2A, el tratamiento con FLAG-sFGFR3 tuvo un efecto sobre el crecimiento esquelético global. Aunque los ratones *Fgfr3^{ach/+}* fueron en promedio un 20 % más livianos que sus compañeros de camada wt, los animales tratados con FLAG-sFGFR3 exhibieron un aumento en su peso corporal dependiente de la dosis, que alcanzó hasta un 33 % del peso de los ratones transgénicos no tratados (Figura 2B). También se observó un efecto del tratamiento dependiente de la dosis sobre el peso de animales wt. Como se observa en la Figura 2C, el tratamiento indujo un aumento dependiente de la dosis en la longitud corporal y caudal de los animales *Fgfr3^{ach/+}* y wt. Los ratones transgénicos tratados tuvieron una estatura que no fue significativamente diferente de la de los wt testigo no tratados, que alcanzó hasta un 10 % de las longitudes de los animales *Fgfr3^{ach/+}* no tratados en la dosis alta y corrigió la discrepancia inicial entre los ratones transgénicos y wt.

Se obtuvieron resultados similares en las longitudes de huesos largos. Los húmeros, fémures y tibias de ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados fueron más largos que los de ratones transgénicos no tratados y fueron estadísticamente idénticos a las longitudes de los huesos de wt (Figura 2D). El tratamiento con FLAG-sFGFR3 también tuvo un efecto dependiente de la dosis sobre el crecimiento de huesos largos en ratones wt. Efecto del tratamiento sobre la maduración de condrocitos confirmado por histología. Los ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados exhibieron condrocitos organizados e hipertróficos en sus placas de crecimiento de manera similar a los ratones wt.

El tratamiento con sFGFR3 también corrigió el desarrollo de la caja torácica en ratones *Fgfr3^{ach/+}*. En general, estos resultados muestran que después de la administración subcutánea crónica de FLAG-sFGFR3 a ratones *Fgfr3^{ach/+}* neonatos, se restauró el crecimiento óseo normal y que también fue eficaz sobre el crecimiento esquelético de animales que no desencadenan una mutación que activa FGFR3. De hecho, los ratones *Fgfr3^{ach/+}* y WT tratados con sFGFR3 exhibieron mayor osificación y longitudes del esternón en comparación con los animales tratados con vehículo en sus respectivos grupos.

Tabla S1: Comparación estadística de mediciones corporales entre machos y hembras en los diferentes grupos de tratamiento. Después de 3 semanas de tratamientos (PBS, 0,5 ng o 5 ng de FLAG-sFGFR3), los animales se sacrificaron con 22 días. Se midieron el peso corporal, la longitud corporal y la longitud de la cola. Se determinaron el género y el genotipo. Después de la verificación de la variación de la normalidad en cada conjunto de datos, las mediciones se compararon entre machos y hembras dentro del mismo grupo de tratamiento y genotipo. Los datos exhibieron distribución normal; se usó una prueba de la t de Student para comparar datos con mediciones obtenidas en ratones no tratados. No se halló diferencia estadística en ningún grupo. ns=no significativa. wt.: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

35

ES 2 796 743 T3

			n	Peso corporal (g)	Longitud corporal (mm)	Longitud caudal (mm)	macho frente a hembra
PBS	wt	macho	41	11,09 ± 1,26	132,43 ± 5,45	70,49 ± 3,65	ns
		hembra	26	10,67 ± 1,99	134,04 ± 6,76	71,76 ± 4,60	
	ach	macho	13	9,18 ± 1,82	120,56 ± 5,71	64,36 ± 2,52	ns
		hembra	11	8,14 ± 1,55	113,95 ± 8,22	60,03 ± 3,79	
0,5 ng de sFGFR3	wt	macho	12	12,31 ± 1,27	134,55 ± 7,98	73,94 ± 6,35	ns
		hembra	19	12,03 ± 1,18	134,59 ± 6,46	72,25 ± 4,51	
	ach	macho	19	10,50 ± 1,19	126,78 ± 9,38	69,48 ± 6,64	ns
		hembra	17	9,34 ± 1,47	121,49 ± 10,01	65,33 ± 7,96	
5 ng de sFGFR3	wt	macho	23	13,29 ± 1,48	141,47 ± 6,77	74,76 ± 5,42	ns
		hembra	24	12,13 ± 1,85	138,73 ± 8,21	74,01 ± 6,01	
	ach	macho	13	11,41 ± 3,14	130,43 ± 13,11	69,15 ± 9,07	ns
		hembra	37	10,72 ± 2,19	127,59 ± 11,58	67,43 ± 7,95	

- 5 El tratamiento con FLAG-sFGFR3 disminuye deformaciones espinales y craneales asociadas a la acondroplasia en ratones *Fgfr3^{ach/+}*: En ratones *Fgfr3^{ach/+}*, las anomalías espinales se reconocen en particular por la presencia de una cifosis que se puede caracterizar por el cálculo de un índice cifótico (KI). En este sistema de puntuación, establecido por Laws *et al.* (28), ratones con un KI < 4,0 presentan una cifosis (para obtener más detalles, consulte la leyenda de la Figura 3). En el presente estudio, aunque ningún animal wt presentó una deformación espinal, el 80 % de los ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados exhibió cifosis cervical con un promedio de KI de $3,46 \pm 0,65$ (Figura 3A). Con el tratamiento con FLAG-sFGFR3, este porcentaje disminuyó significativamente hasta 17 % y 6 % en los grupos con 0,5 ng y 5 ng, respectivamente.
- 10 Para caracterizar adicionalmente la maduración vertebral, los inventores analizaron la osificación de C7 y T11. Como se observa en la Figura 3B, en ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados, la 7ª cervical y la 11ª torácica no estaban fusionadas en la línea media en 88,9 % y 70,1 %, respectivamente. Después del tratamiento, la maduración se restauró como se observa por la disminución en la cantidad de vértebras inmaduras. Ningún animal wt en ninguno de los grupos presentó vértebras inmaduras.
- 15 De manera similar a los pacientes con acondroplasia que típicamente tienen cabezas agrandadas, los ratones *Fgfr3^{ach/+}* padecen deformaciones craneales. Aunque el ancho del cráneo (W, por su sigla en inglés) no es estadísticamente diferente entre ratones transgénicos y wt ($10,35 \pm 0,28$ mm frente a $10,17 \pm 0,32$ mm, respectivamente), la longitud (L) es significativamente más corta en ratones *Fgfr3^{ach/+}* ($18,11 \pm 0,75$ mm frente a $20,05 \pm 0,51$ mm en ratones wt, respectivamente). Esto conduce a una relación L/W igual a $1,75 \pm 0,77$ en ratones *Fgfr3^{ach/+}* no tratados e igual a $1,94 \pm 0,05$ en ratones wt testigo (Figura 4A). El tratamiento con FLAG-sFGFR3 indujo una corrección dependiente de la dosis de la longitud del cráneo y la relación L/W no fue significativamente diferente de la de los wt tratados en la dosis más alta de FLAG-sFGFR3.
- 20 Como se observa en la Figura 4B, el tratamiento también previno el cierre prematuro de la sincondrosis craneal típicamente observada en ratones *Fgfr3^{ach/+}*.
- 25 En general, estos resultados muestran que el tratamiento con FLAG-sFGFR3 es eficaz para prevenir el desarrollo de deformaciones del esqueleto asociadas a la acondroplasia.

No se detectan efectos toxicológicos en animales tratados: Debido a que los inventores usan una estrategia sistémica para suministrar el FGFR3 soluble recombinante, pusieron especial atención en los posibles efectos secundarios

indeseados. Analizaron los órganos de los 255 animales, llevaron a cabo análisis de sangre bioquímicas y de numeración y verificaron la fertilidad de algunos animales tratados (dos camadas por grupo) incluida la normalidad de su descendencia.

5 Los posibles efectos secundarios del tratamiento se evaluaron primero en varios órganos (hígado, pulmón, corazón, bazo, riñones) en el momento del sacrificio. Los órganos se observaron macroscópicamente, se pesaron y se analizaron de manera aleatoria microscópicamente por histología. Ninguno de los 255 animales que recibieron inyecciones subcutáneas crónicas de FLAG-sFGFR3 o PBS presentaron anomalías macroscópicas. La histología se llevó a cabo en órganos seleccionados aleatoriamente en todos los grupos y los datos fueron analizados con enmascaramiento por un anatomopatólogo. No se observaron signos de toxicidad en ninguna de los cortes histológicos.

10 En todos los grupos testigo, los pesos de los órganos se correlacionaron con el peso corporal del ratón (Tabla 2). En los grupos tratados, los órganos se incrementaron con el crecimiento óseo mejorado. Como ejemplo, los pulmones de ratones *Fgfr3^{ach/+}* pesaron $156,0 \pm 88,7$ mg. Se incrementaron hasta $172,5 \pm 67,5$ mg en el grupo de tratamiento con 5 ng, alcanzando el peso de los pulmones en ratones wt no tratados ($170,5 \pm 36,3$ mg). Se hallaron resultados similares en todos los órganos y este aumento de peso se correlacionó estadísticamente con el aumento del peso corporal en todos los grupos (Tabla 2). Para evaluar las funciones orgánicas, se llevaron a cabo análisis de sangre bioquímicas que incluyeron valoración de electrolitos, ensayos enzimáticos de hígado, riñón y bazo. Todas las pruebas demostraron ser estadísticamente idénticas entre los animales *Fgfr3^{ach/+}* y wt en los grupos tratados y testigo (Tabla S2). Los recuentos sanguíneos también se analizaron y de manera similar, no se observaron diferencias entre las formulaciones sanguíneas entre los grupos tratados y testigo (Tabla S3).

20 Tabla 2: Coeficiente de correlación (r) entre órgano y peso corporal en los diferentes grupos de tratamiento. Se usaron pruebas de Pearson o Spearman para el análisis estadístico de las correlaciones de órgano/peso corporal en cada grupo de tratamiento; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

Tratamiento	Hígado	Corazón	Pulmón	Bazo	Riñón
PBS	0,892 ***	0,748 ***	0,857 ***	0,655 ***	0,877 ***
0,5 ng de sFGFR3	0,883 **	0,777 **	0,731 *	0,774 *	0,777 **
5 ng de sFGFR3	0,881 ***	0,794 ***	0,720 ***	0,584 **	0,531 *
PBS	0,941 ***	0,943 ***	0,886 **	0,726 **	0,848 ***
0,5 ng de sFGFR3	0,921 ***	0,758 *	0,709 **	0,650 *	0,828 ***
5 ng de sFGFR3	0,957 ***	0,983 ***	0,885 ***	0,883 ***	0,850 ***

25 Tabla S2. Los parámetros bioquímicos sanguíneos no sufrieron modificaciones por el tratamiento con FLAG-sFGFR3. Para evaluar la toxicidad del tratamiento, en el momento del sacrificio, se analizó el plasma de los grupos que recibieron PBS y 5 ng de FLAG-sFGFR3 mediante el uso de un Beckman AU 2700 Analyzer. La salud general se evaluó mediante mediciones de electrolitos (Na^+ , K^+ , Cl^-), lactato deshidrogenasa (LDH) y colesterol. La función renal se evaluó mediante ensayos de creatinina y creatinina cinasa (CK). Las funciones hepática y pancreática se evaluaron mediante aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total (BLT) y amilasa,

30 respectivamente. Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante el uso de un ANOVA unidireccional. No se halló diferencia estadística en ningún grupo. wt.: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

	Tratamiento	Na	K	Cl	LDH	Colesterol
		(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(UI/L)	(mmol/L)
wt	PBS	$810,8 \pm 80,8$	$9,26 \pm 0,51$	$75,20 \pm 3,81$	1672 ± 124	$0,99 \pm 0,15$
	5 ng sFGFR3	$818,3 \pm 69,4$	$8,75 \pm 0,59$	$72,83 \pm 1,14$	2059 ± 478	$0,90 \pm 0,16$
ach	PBS	$709,7 \pm 90,5$	$8,97 \pm 0,98$	$81,79 \pm 3,79$	1675 ± 228	$1,06 \pm 0,11$
	5 ng sFGFR3	$706,2 \pm 57,0$	$9,20 \pm 0,77$	$76,33 \pm 0,88$	1738 ± 402	$1,02 \pm 0,08$

	Tratamiento	Creatinina (μmol/L)	Creatinina cinasa (UI/L)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Amilasa (UI/L)	Bilirrubina total (μmol/L)	
wt	PBS	9,00 ± 1,26	1389 ± 679	155,1 ± 27	65,5 ± 16,5	138,1 ± 4,7	22,8 ± 1,7	
	5 ng sFGFR3	10,20 ± 0,95	655 ± 180	137,0 ± 24,6	42,3 ± 4,2	112,0 ± 8,0	20,8 ± 0,4	
ach	PBS	9,18 ± 551 ± 140,1 ± 48,2 ± 129,8 ± 21,8 ±	1,60	127	22,9	14,6	21,4	1,1
		5 ng sFGFR3	12,33 ± 943 ± 196,4 ± 77,7 ± 192,0 ± 20,3 ±	1,43	261	51,2	14,5	33,3

5 Tabla S3. Los recuentos sanguíneos no sufrieron modificaciones por el tratamiento con FLAG-sFGFR3. Los efectos de tratamiento con FLAG-sFGFR3 sobre los recuentos sanguíneos se evaluaron en muestras de plasma en el momento del sacrificio. El análisis incluyó recuentos de hemoglobina (Hb), hematocrito (Ht), leucocitos (WBC, por sus siglas en inglés), eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés) y plaquetas (PLT). Se evaluaron los porcentajes de las diferentes poblaciones de leucocitos (NE: neutrófilos; LY: linfocitos, MO: monocitos, EO: eosinófilos; BA: basófilos). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo mediante el uso de un ANOVA unidireccional. No se halló diferencia estadística en ningún grupo. wt.: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

	Tratamiento	Hb (g/dL)	Ht (%)	WBC (K/μl)	RBC (K/μl)	PLT (K/μl)
wt	PBS	8,11 ± 0,11	16,82 ± 1,72	4,31 ± 0,39	5,63 ± 0,02	471,1 ± 26,9
	5 ng sFGFR3	8,56 ± 0,06	23,21 ± 1,33	5,28 ± 0,54	5,81 ± 0,01	447,0 ± 32,2
ach	PBS	8,32 ± 0,26	22,5 ± 4,74	3,37 ± 0,49	5,47 ± 0,18	472,0 ± 112,8
	5 ng sFGFR3	8,25 ± 0,15	17,44 ± 1,12	5,86 ± 0,81	5,67 ± 0,04	620,0 ± 28,8

	Tratamiento	NE (%)	LY (%)	MO (%)	EO (%)	BA (%)
wt	PBS	30,76 ± 1,86	53,56 ± 2,49	7,52 ± 0,59	5,89 ± 0,44	2,27 ± 0,27
	5 ng sFGFR3	25,54 ± 2,37	56,90 ± 3,15	9,78 ± 0,67	5,75 ± 0,54	1,83 ± 0,24
ach	PBS	24,25 ± 6,08	60,02 ± 8,86	6,56 ± 1,48	6,59 ± 1,72	2,56 ± 0,59
	5 ng sFGFR3	29,25 ± 1,47	51,88 ± 2,39	10,16 ± 0,82	6,99 ± 1,20	1,85 ± 0,33

10 Para evaluar los efectos secundarios indeseados sobre la fecundidad, después del tratamiento de tres semanas, los animales se destetaron y se aparearon a las 8 semanas del nacimiento con machos o hembras FVB wt de Charles River. Como se observa en la Tabla 3, todos los animales tratados fueron fértiles y su descendencia tuvo un tamaño normal con aproximadamente 50 % de descendientes wt / 50 % de *Fgfr3^{ach/+}*. Aunque las hembras *Fgfr3^{ach/+}* habitualmente tienen una primera camada ligeramente reducida en tamaño en comparación con las hembras wt, es interesante señalar que las hembras transgénicas tratadas primíparas tuvieron camadas que fueron idénticas en tamaño a las hembras wt primíparas, lo que confirma el ensanchamiento de su pelvis después del tratamiento (Tabla 3).

20 Tabla 3: El tratamiento de FLAG-sFGFR3 no afectó la fertilidad de los ratones tratados. Las crías de dos camadas por grupo se destetaron después del tratamiento de tres semanas. Se aparearon a las 8 semanas del nacimiento con animales wt de Charles River. La cantidad de crías de la primera camada se contó para cada hembra primípara. A los 22 días, los animales se sometieron a eutanasia. Se evaluó su crecimiento corporal como anteriormente. Se usó una prueba de la t de Student para comparar datos con mediciones de animales wt no tratados generados a partir de los genitores testigo. ****p*<0,001 frente wt no tratados. N/A: no aplicable, wt: ratones naturales; ach: ratones *Fgfr3^{ach/+}*.

		Tamaño de la camada	% de wt y ach el día 22	Peso corporal (g)	Longitud corporal (mm)
Genitores testigo	ach ♂ x wt ♀	9,2 ± 0,9	74 % de wt, 26 % de ach	wt, 10,88 ± 1,62	wt, 133,24 ± 6,11
	wt ♂ x ach ♀	7,7 ± 0,7 ***		ach, 8,66 ± 1,68 ***	ach, 117,25 ± 6,96 ***
tratados con sFGFR3	ach tratados ♂ x wt ♀	10,2 ± 1,9	% de wt, % de ach		
	wt tratados ♂ x wt ♀	9,7 ± 0,9	N/P		
	wt ♂ x ach tratados ♀	10,6 ± 1,5	% de wt, % de ach		
	wt ♂ x wt tratados ♀	9,8 ± 1,9	N/P		

En general, estos experimentos no destacaron ninguna complicación del tratamiento con FLAG-sFGFR3 en sí mismo, ni en la formulación sanguínea, la función y el desarrollo orgánico ni la fertilidad de los animales tratados, lo que sugiere que el uso de una forma soluble de FGFR3 puede ser una estrategia de tratamiento viable para aplicaciones clínicas.

Discusión:

El presente estudio valida la viabilidad preliminar de que una estrategia terapéutica basada en el uso de una forma soluble de FGFR3 puede prevenir el crecimiento óseo anormal en ratones que presentan la mutación de la acondroplasia. El tratamiento se administró dos veces a la semana por inyecciones subcutáneas a los animales a lo largo del período de crecimiento. Después de este período de tratamiento de tres semanas, el crecimiento óseo endocondral resultante condujo a una estatura normal, armoniosa. De manera importante, estos efectos fueron dependientes de la dosis; la dosis de 0,5 ng de FLAG-sFGFR3 fue suficiente para inducir peso corporal y longitud que fueron idénticos al de los ratones wt no tratados y a la dosis de 5 ng, los ratones enanos tratados fueron incluso más pesados y tuvieron huesos largos más largos que los animales wt no tratados. Principalmente, los presente resultados hacen énfasis en la noción de que la mutación de la acondroplasia requiere la unión de un ligando para activarse. De hecho, se ha demostrado que en el caso de la mutación G380R, la activación de FGFR3 es dependiente del ligando (12), pero no todavía no hay un consenso claro en la literatura (29-31), lo cual sugiere que, no uno sino múltiples mecanismos conducen a la señalización intracelular prolongada.

Aunque fue esencial la restauración del crecimiento de los huesos largos para que el tratamiento fuera eficaz, fue fundamental influir también de manera significativa sobre la aparición de las complicaciones, debido a deformaciones esqueléticas. Para los inventores, esto es indispensable si se desea desarrollar un tratamiento para la clínica. La restauración de la maduración de las vértebras y el cierre normal de las sincondrosis craneales en ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados tuvo numerosos efectos sobre estos animales. La primera consecuencia fue la mortalidad reducida ente la población transgénica. Como se indica en la sección de resultados, la autopsia reveló fallas respiratorias en la mayoría de los casos. En función de las características anatómicas del cráneo y las vértebras de ratones enanos, los inventores creen que estas fueron consecuencia de la compresión del tronco encefálico, similar a lo que se puede observar en pacientes con acondroplasia.

Un segundo desenlace clínico del efecto del tratamiento fue un desplazamiento en la penetrancia de fenotipo. Aunque las mediciones podrían parecer como que los efectos del tratamiento no fueron totalmente dependientes de la dosis y, de manera más importante, no tan eficaces como se podría esperar en función de los pesos corporales, los inventores creen que, en la dosis más alta, el tratamiento salvó a los ratones *Fgfr3^{ach/+}* más pequeños de la compresión del tronco encefálico y la falla respiratoria. Sin tratamientos, estos animales no habrían sobrevivido más allá de la semana 1 o 2. En este grupo de tratamiento, los inventores hipotetizan que estos animales son los que permanecen muy pequeños, aunque tienen menos complicaciones graves.

A pesar de la cantidad creciente de informes que estudian los mecanismos subyacentes a la acondroplasia y displasia esquelética relacionada, solo se han publicado tres estudios que muestran estrategias terapéuticas evaluadas de manera eficaz en ratones con condrodisplasia. Xie et al. recientemente publicaron un informe de que el tratamiento con PTH intermitente rescata parcialmente el crecimiento óseo en ratones con acondroplasia (32). En su estudio, la PTH se administra subcutáneamente en la dosis de 100 µg/kg de peso corporal por día durante 4 semanas después del nacimiento. Aunque el mecanismo por el cual la PTH afecta la señalización intracelular de FGFR3 no se ha establecido claramente, el crecimiento óseo se rescató parcialmente en ratones transgénicos tratados; los ratones transgénicos tratados con PTH todavía eran más pequeños que sus compañeros de camada wt. En este estudio, se mencionó apenas muy poca información relacionada con las complicaciones de la acondroplasia, excepto el rescate parcial de la sincondrosis craneal. El fenotipo letal de ratones TDII también se rescató con tratamiento crónico con PTH de las hembras gestantes. Otro posible antagonista terapéutico de la señalización de FGFR3 es el péptido C-natriurético (CNP) (33). En esta publicación, los autores trataron a ratones transgénicos con acondroplasia mediante infusión intravenosa continua de CNP sintético durante 3 semanas comenzado 4 semanas después del nacimiento. Se cree que el CNP aumenta el ancho de la placa de crecimiento y acelera la actividad de la placa de crecimiento. El principal obstáculo para el uso en humanos es la semivida muy corta del CNP, que se estima que es de 2,6 min en plasma (34).

Muy recientemente, se ha publicado un estudio que describe el uso de un nuevo péptido de unión a FGFR3 que rescata el fenotipo letal y restaura parcialmente la distorsión estructural de las placas de crecimiento en ratones TDII, observado en 12 crías (19). En este estudio, los efectos sobre la señalización de MAPK y la corrección del crecimiento óseo fueron solo parciales y se requirió una administración diaria debido probablemente a la semivida corta del péptido. Aquí, los efectos de sFGFR3 fueron de mayor magnitud, con una restauración completa de la estatura normal. Los inventores creen que la semivida de la forma soluble de FGFR3 que contiene dominios similares a IgG se prolonga significativamente. De hecho, se necesitaron solo 6 inyecciones (entre el nacimiento y el destete) para restaurar completamente el crecimiento óseo en los 86 ratones *Fgfr3^{ach/+}* tratados. Se pueden imaginar que serían necesarias solo unas pocas inyecciones para tratar la acondroplasia en niños como pacientes ambulatorios, comenzando durante el primer año hasta la pubertad. Esto influiría sustancialmente sobre la aparición de efectos secundarios de la inyección, que se encuentran típicamente con regímenes de inyecciones diarias. El uso de una proteína recombinante soluble también posibilita la suspensión rápida durante el tratamiento si surgen problemas de seguridad y en la pubertad cuando el crecimiento óseo cesa. Si es necesario, también se puede alternar entre períodos de tratamiento y reposo. Al prevenir las complicaciones, el tratamiento con sFGFR3 evitaría la necesidad de intervenciones quirúrgicas y también reduciría cualquier estrés debido a la hospitalización. Además, nuestro estudio no reveló ningún efecto toxicológico sobre la sangre ni la fertilidad y descendencia de los animales tratados. Hay estudios actuales en curso para evaluar si el tratamiento con sFGFR3 de tres semanas tuvo un efecto sobre la salud a largo plazo de los ratones tratados. A la fecha, los ratones tratados tienen 6 meses y ningún efecto secundario visible y los análisis de sangre son normales.

En conclusión, el presente estudio demuestra la viabilidad de dirigirse hacia FGFR3 en el compartimento extracelular como un tratamiento eficaz para restaurar la maduración de la placa de crecimiento e inducir el crecimiento óseo normal en la acondroplasia. La ausencia de efectos secundarios indeseados valida su uso como una terapia prometedora para esta y la condrodisplasia relacionada causada por la activación de la mutación en receptores de FGF. Además, en el presente estudio, los inventores también divulgan un efecto positivo del tratamiento con sFGFR3 en el crecimiento de animales wt. Esto tiene importancia ya que sugiere su posible interés para el tratamiento de retrasos del crecimiento idiopáticos, o para prevenir complicaciones graves en otras enfermedades raras tales como la hipofosfatasa.

Referencias:

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que corresponde la presente invención.

1. D. M. Ornitz, FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 205 (Abr, 2005).

2. M. L. Martínez-Frías, C. A. de Frutos, E. Bermejo, M. A. Nieto, Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia. *Am J Med Genet A* 152A, 245 (Ene, 2010).

3. W. A. Horton, G. P. Lunstrum, Fibroblast growth factor receptor 3 mutations in achondroplasia and related forms of dwarfism. *Rev Endocr Metab Disord* 3,381 (Dic, 2002).

4. M. J. Wright, M. D. Irving, Clinical management of achondroplasia. *Arch Dis Child* 97, 129 (Feb, 2012).

5. W. A. Horton, J. G. Hall, J. T. Hecht, Achondroplasia. *Lancet* 370, 162 (Jul 14, 2007).

6. E. D. Shirley, M. C. Ain, Achondroplasia: manifestations and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 17, 231 (Abr, 2009).

7. P. Richette, T. Bardin, C. Stheneur, Achondroplasia: from genotype to phenotype. *Joint Bone Spine* 75, 125 (Mar, 2008).
8. F. Rousseau et al., Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371, 252 (Sep 15, 1994).
- 5 9. G. A. Bellus et al., Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet* 56, 368 (Feb, 1995).
10. R. Shiang et al., Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78, 335 (Jul 29, 1994).
- 10 11. F. Rousseau et al., Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia. *Horm Res* 45, 108 (1996).
12. E. Monsonego-Ornan, R. Adar, T. Feferman, O. Segev, A. Yayon, The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol* 20, 516 (Ene, 2000).
- 15 13. D. Harada et al., Sustained phosphorylation of mutated FGFR3 is a crucial feature of genetic dwarfism and induces apoptosis in the ATDC5 chondrogenic cell line via PLCgamma-activated STAT1. *Bone* 41, 273 (Ago, 2007).
14. E. Monsonego-Ornan, R. Adar, E. Rom, A. Yayon, FGF receptors ubiquitylation: dependence on tyrosine kinase activity and role in downregulation. *FEBS Lett* 528, 83 (Sep 25, 2002).
15. M. K. Webster, D. J. Donoghue, Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J* 15, 520 (Feb 1, 1996).
- 20 16. M. B. Laederich, W. A. Horton, FGFR3 targeting strategies for achondroplasia. *Expert Rev Mol Med* 14, e11 (2012).
17. C. Deng, A. Wynshaw-Boris, F. Zhou, A. Kuo, P. Leder, Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911 (Mar 22, 1996).
18. Z. Vajo, C. A. Francomano, D. J. Wilkin, The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 21, 23 (Feb, 2000).
- 25 19. M. Jin et al., A novel FGFR3-binding peptide inhibits FGFR3 signaling and reverses the lethal phenotype of mice mimicking human thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet*, (Oct 9, 2012).
20. S. Garofalo et al., Skeletal dysplasia and defective chondrocyte differentiation by targeted overexpression of fibroblast growth factor 9 in transgenic mice. *J Bone Miner Res* 14, 1909 (Nov, 1999).
- 30 21. D. Davidson et al., Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem* 280, 20509 (May 27, 2005).
22. M. C. Naski, J. S. Colvin, J. D. Coffin, D. M. Ornitz, Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977 (Dic, 1998).
- 35 23. T. D. Papakostas et al., Development of an efficiently cleaved, bioactive, highly pure FLAG-tagged recombinant human Mullerian Inhibiting Substance. *Protein Expr Purif* 70, 32 (Mar, 2010).
24. K. Terpe, Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523 (Ene, 2003).
25. J. P. Louboutin, B. A. Reyes, L. Agrawal, E. Van Bockstaele, D. S. Strayer, Strategies for CNS-directed gene delivery: in vivo gene transfer to the brain using SV40-derived vectors. *Gene Ther* 14, 939 (Jun, 2007).
- 40 26. L. R. Rodino-Klapac et al., Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. *Mol Ther* 18, 109 (Ene, 2010).
27. F. M. Altaf, T. M. Hering, N. H. Kazmi, J. U. Yoo, B. Johnstone, Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater* 12, 64 (2006).
28. N. Laws, A. Hoey, Progression of kyphosis in mdx mice. *J Appl Physiol* 97, 1970 (Nov, 2004).
- 45 29. J. Placone, K. Hristova, Direct Assessment of the Effect of the Gly380Arg Achondroplasia Mutation on FGFR3 Dimerization Using Quantitative Imaging FRET. *PLoS One* 7, e46678 (2012).

30. L. He, W. Horton, K. Hristova, Physical basis behind achondroplasia, the most common form of human dwarfism. *J Biol Chem* 285, 30103 (Sep 24, 2010).
31. L. He, N. Shobnam, W. C. Wimley, K. Hristova, FGFR3 heterodimerization in achondroplasia, the most common form of human dwarfism. *J Biol Chem* 286, 13272 (Abr 15,2011).
- 5 32. Y. Xie et al., Intermittent PTH (1-34) injection rescues the retarded skeletal development and postnatal lethality of mice mimicking human achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet* 21, 3941 (Sep 15, 2012).
33. A. Yasoda et al., Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology* 150, 3138 (Jul, 2009).
- 10 34. P. J. Hunt, A. M. Richards, E. A. Espiner, M. G. Nicholls, T. G. Yandle, Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1428 (Jun, 1994).
35. M. Terada et al., Fibroblast growth factor receptor 3 lacking the Ig IIIb and transmembrane domains secreted from human squamous cell carcinoma DJM-1 binds to FGFs. *Mol Cell Biol Res Commun* 4,365 (Nov, 2001).
36. A. Bertola et al., Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. *J Biol Chem* 282, 10325 (Abr, 2007).
- 15 **Listado de secuencias**
- <110> INSERM
- <120> UN POLIPÉPTIDO DE RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 3 (FGR3) SOLUBLE PARA SU USO EN LA PREVENCIÓN O TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DE RETRASO DEL CRECIMIENTO ESQUELÉTICO
- 20 <130> 12345GOUZE/AS
- <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 694
- 25 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Polipéptido de FGFR3 soluble (sFGFR3) humano
- <400> 1

ES 2 796 743 T3

Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
 1 5 10 15

Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
 20 25 30

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln
 35 40 45

Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro
 50 55 60

Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly
 65 70 75 80

Leu Val Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Gln Val
 85 90 95

Leu Asn Ala Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg
 100 105 110

Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
 130 135 140

Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
 145 150 155 160

ES 2 796 743 T3

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

ES 2 796 743 T3

Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala
 420 425 430

Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys
 435 440 445

Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp
 450 455 460

Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys
 465 470 475 480

Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu
 485 490 495

Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu
 500 505 510

Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg
 515 520 525

Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu
 530 535 540

Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 545 550 555 560

His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe
 565 570 575

Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe
 580 585 590

Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr
 595 600 605

His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser
 610 615 620

Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Val Leu
 625 630 635 640

Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro Phe Glu
 645 650 655

Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
 660 665 670

Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
 675 680 685

Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 690

<210> 2

ES 2 796 743 T3

<211> 2082

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de ADN de FGFR3 soluble humano optimizada para disminuir el contenido de GC

<400> 2

```

atgggcgccc ctgcctgcgc cctcgcgctc tgcgtggccg tggccatcgt ggccggcgcc 60
tcctcggagt ccttggggac ggagcagcgc gtcgtggggc gagcggcaga agtcccgggc 120
ccagagcccg gccagcagga gcagttggtc ttcggcagcg gggatgctgt ggagctgagc 180
tgtccccgc ccgggggtgg tcccatgggg cccactgtct gggcaagga tggcacaggg 240
ctggtgccct cggagcgtgt cctggtgggg cccagcggc tgcaggtgct gaatgcctcc 300
cacgaggact ccggggccta cagctgccgg cagcggctca cgcagcgcgt actgtgccac 360
ttcagtgtag ggtgacaga cgctccatcc tcgggagatg acgaagacgg ggaggacgag 420
gctgaggaca caggtgtgga cacaggggcc ccttactgga cacggcccga gcggatggac 480
aagaagtgc tggcctgccc ggccgccaac accgtccgct tccgctgccc agccgctggc 540
aaccactc cctccatctc ctggctgaag aacggcaggg agttccgagg cgagcaccgc 600
attggaggca tcaagctgag gcatcagcag tggagcctgg tcatggaag cgtggtgccc 660
tcggaccgag gcaactacac ctgcgtcgtg gagaacaagt ttggcagcat ccggcagacg 720
tacacgctgg acgtgctgga gcgctccccg caccggccca tcctgcaggc ggggctgccg 780
gccaaccaga cggcgggtgct gggcagcgac gtggagtcc actgcaaggt gtacagtgac 840
gcacagcccc acatccagtg gctcaagcac gtggaggtga atggcagcaa ggtgggcccg 900
gacggcacac cctacgttac cgtgctcaag gtgtccctgg agtccaacgc gtccatgagc 960
tccaacacac cactggtgag catcgcaagg ctgtcctcag gggagggccc cacgctggcc 1020
aatgtctccg agctcagact gcctgccgac cccaaatggg agctgtctcg ggcccggctg 1080
accctgggca agccccttgg ggagggctgc ttcggccagg tggcatggc ggaggccatc 1140
ggcattgaca aggaccgggc cgccaagcct gtcaccgtag ccgtgaagat gctgaaagac 1200
gatgccactg acaaggacct gtcggacctg gtgtctgaga tggagatgat gaagatgatc 1260
gggaaacaca aaaacatcat caacctgctg ggcgcctgca cgcagggcgg gccctgtac 1320

```

ES 2 796 743 T3

gtgctggtgg agtacgctgc caagggtaac ctgcgggagt ttctgcgggc gcggcggccc 1380
 ccgggcctgg actactcctt cgacacctgc aagccgcccg aggagcagct caccttcaag 1440
 gacctggtgt cctgtgccta ccaggtggcc cggggcatgg agtacttggc ctcccagaag 1500
 tgcattccaca gggacctggc tgcccgcaat gtgctggtga ccgaggacaa cgtgatgaag 1560
 atcgcagact tcgggctggc ccgggacgtg cacaacctcg actactacaa gaagacaacc 1620
 aacggccggc tgcccgtgaa gtggatggcg cctgaggcct tgtttgaccg agtctacact 1680
 caccagagtg acgtctggtc ctttggggtc ctgctctggg agatcttcac gctggggggc 1740
 tccccgtacc ccggcatccc tgtggaggag ctcttcaagc tgctgaagga gggccaccgc 1800
 atggacaagc ccgccaactg cacacacgac ctgtacatga tcatgcggga gtgctggcat 1860
 gccgcgcctt cccagaggcc caccttcaag cagctggtgg aggacctgga ccgtgtcctt 1920
 accgtgacgt ccaccgacga gtacctggac ctgtcggcgc ctttcgagca gtactccccg 1980
 ggtggccagg acacccccag ctccagctcc tcaggggacg actccgtggt tgcccacgac 2040
 ctgctgcccc cggccccacc cagcagtggg ggctcgcgga cg 2082

<210> 3

<211> 806

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

ES 2 796 743 T3

Leu Thr Gln Arg Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Gly Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr
 130 135 140

Gly Val Asp Thr Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp
 145 150 155 160

Lys Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 796 743 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 796 743 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

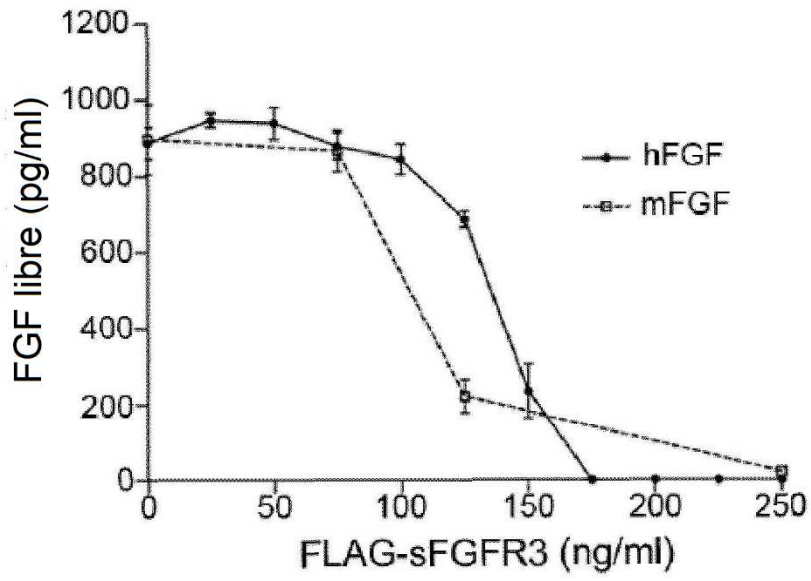
Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro Pro Ser
785 790 795 800

Ser Gly Gly Ser Arg Thr
805

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 soluble (sFGFR3) aislado para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 en un sujeto que lo necesita, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3, comprende un dominio intracelular de FGFR3 y carece de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio transmembranario de FGFR3, y en donde, opcionalmente, el polipéptido de sFGFR3 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar así una inmunoadhesina de sFGFR3.
- 10 2. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 se selecciona del grupo que consiste en acondroplasia, displasia tanatofórica tipo I, displasia tanatofórica tipo II, acondroplasia grave con retraso del desarrollo y acantosis pigmentaria, hipocondroplasia y craneosinostosis relacionada con FGFR3 tal como síndrome de Muenke y síndrome de Crozon con acantosis pigmentaria.
- 15 3. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la enfermedad esquelética relacionada con FGFR3 es causada por la expresión de un mutante de ganancia funcional de FGFR3.
- 20 4. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según la reivindicación 3, en donde el FGFR3 comprende una sustitución de aminoácido de un residuo glicina en la posición 380 de FGFR3 natural humano con un residuo arginina (G380R).
- 25 5. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la región extracelular del polipéptido de sFGFR3 aislado consiste en la región extracelular de FGFR3, que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1.
- 35 7. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado se formula para proporcionar aproximadamente 0,0002 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día del polipéptido de sFGFR3 aislado al sujeto que lo necesita, preferiblemente, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado se formula para proporcionar aproximadamente 0,001 mg/kg/día a aproximadamente 7 mg/kg/día de polipéptido de sFGFR3 aislado al sujeto que lo necesita.
- 40 8. El polipéptido de sFGFR3 aislado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sujeto que lo necesita es un ser humano.
- 45 9. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de sFGFR3 aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad esquelética relacionada con FGFR3.
10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica se formula para administración subcutánea, tópica, oral, intranasal, intravenosa o intramuscular, preferiblemente, en donde la composición farmacéutica se formula para administración subcutánea.
11. El polipéptido de sFGFR3 para su uso según la reivindicación 1, en donde la inmunoadhesina de sFGFR3 comprende una región Fc, preferiblemente, en donde la región Fc es un dominio constante de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG-1, IgG-2 e IgG-3.
12. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 soluble (sFGFR3) aislado, en donde el polipéptido de sFGFR3 aislado comprende al menos 325 aminoácidos consecutivos de la región extracelular del receptor FGFR3, comprende un dominio intracelular de FGFR3 y carece de secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio transmembranario de FGFR3, y en donde, opcionalmente, el polipéptido de sFGFR3 se fusiona con un polipéptido heterólogo para formar así una inmunoadhesina de sFGFR3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

A



B

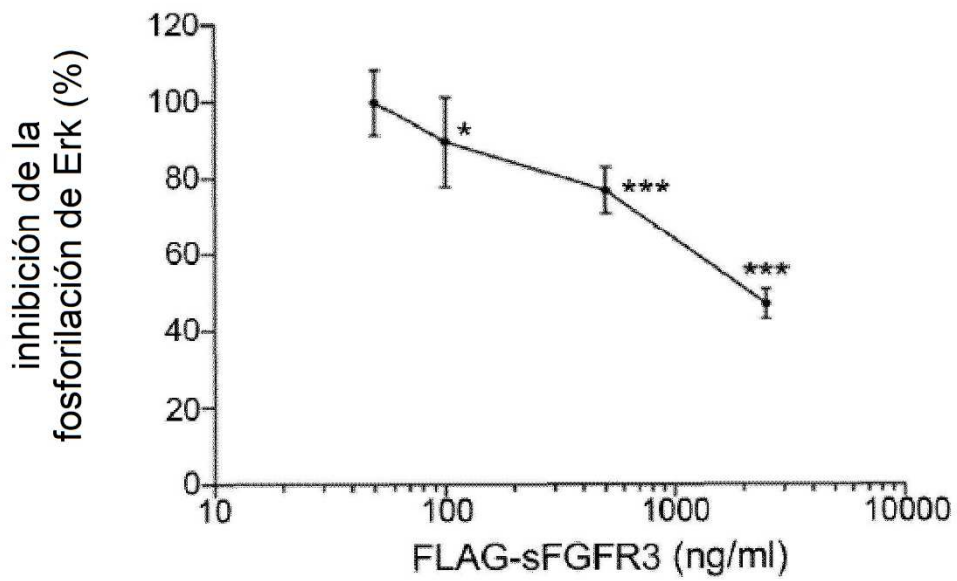


Figura 1

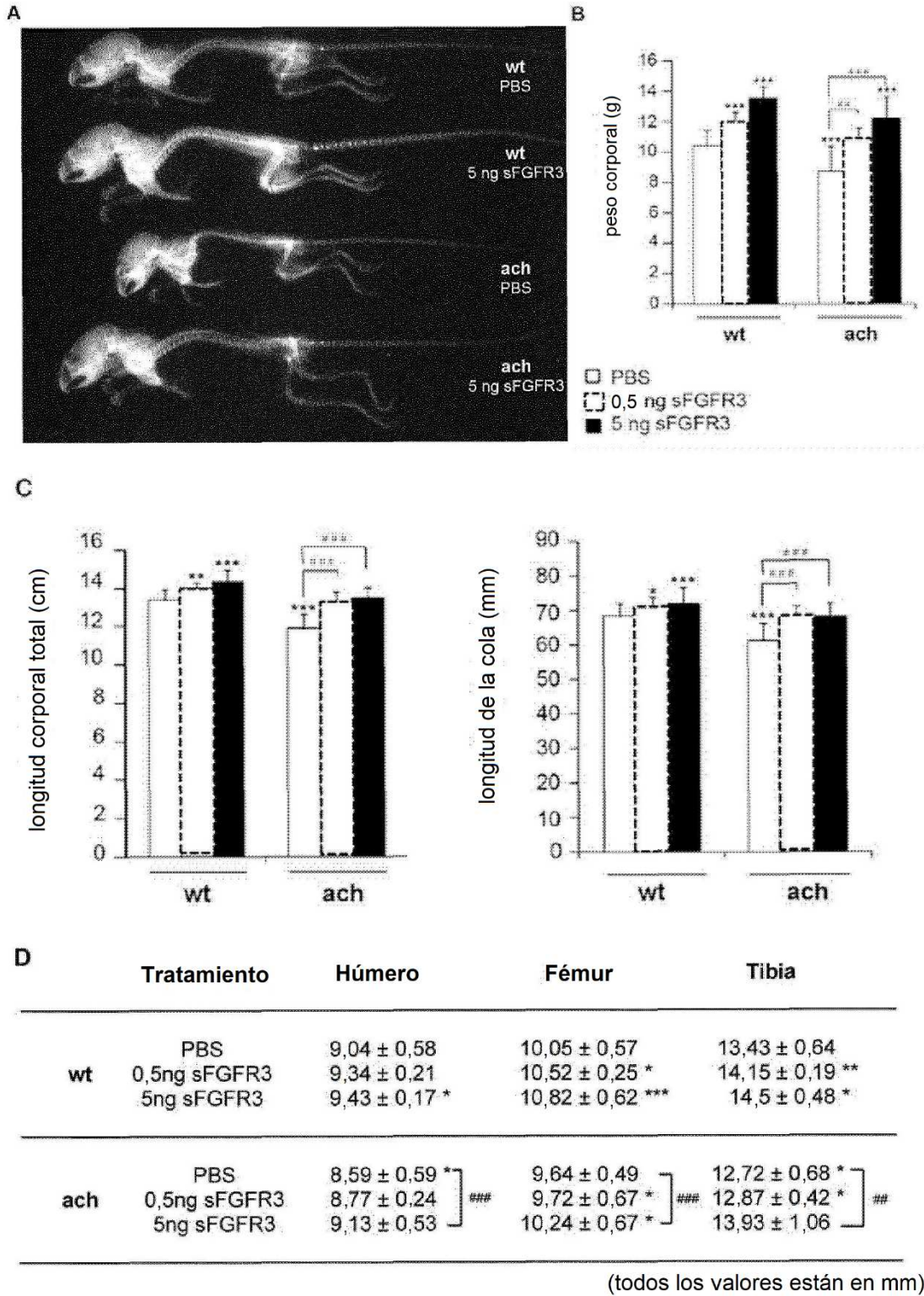


Figura 2

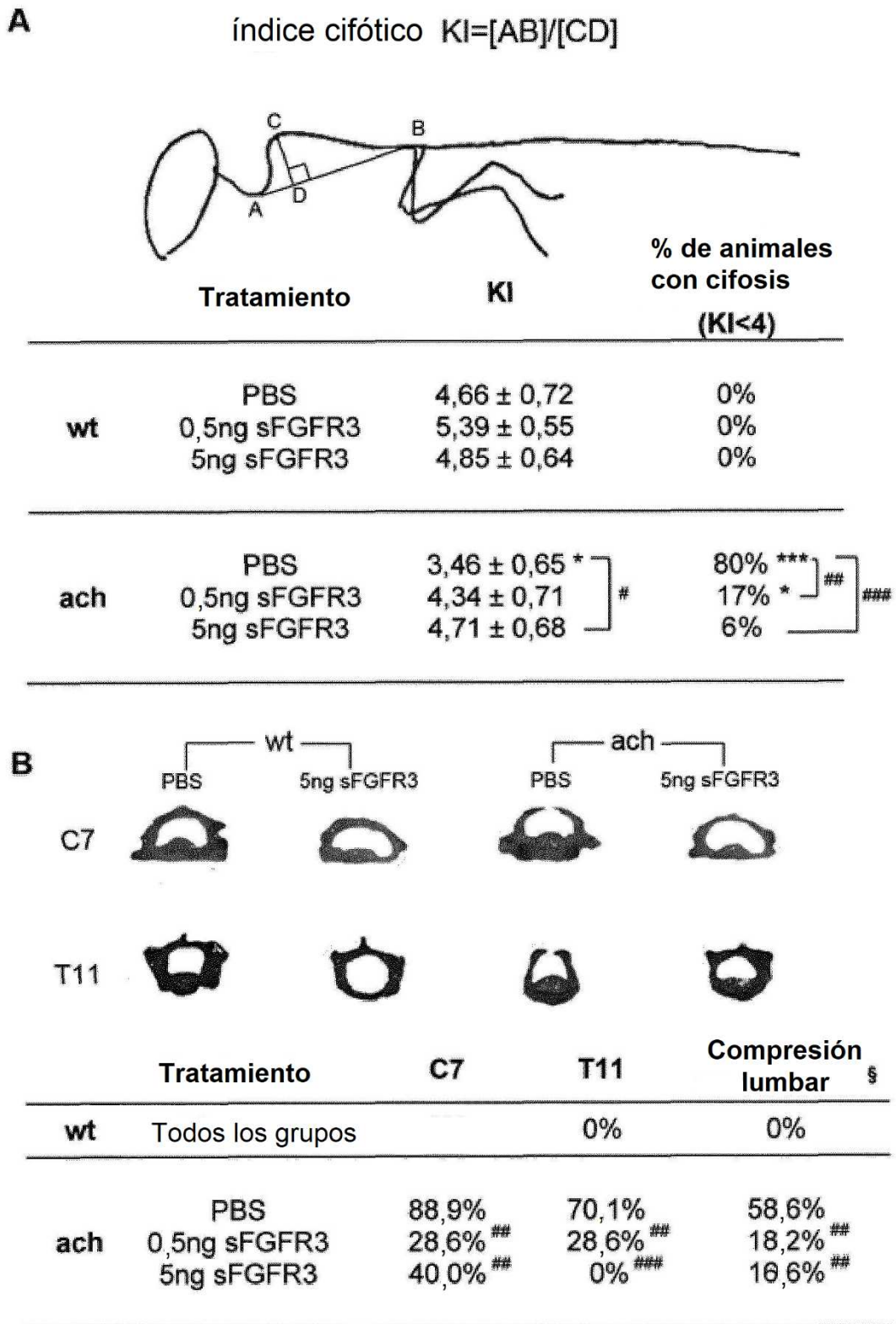
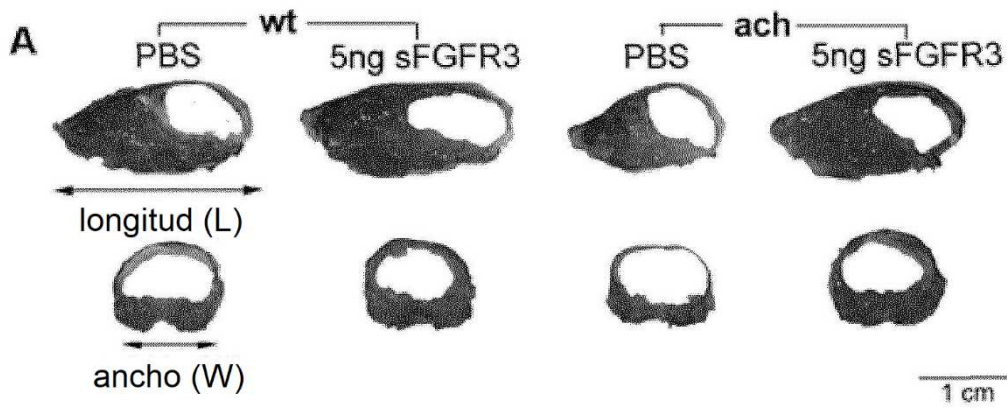


Figura 3



	Tratamiento	Relación L/W
wt	PBS	1,94 ± 0,05
	0,5ng sFGFR3	1,93 ± 0,05
	5ng sFGFR3	1,96 ± 0,07
ach	PBS	1,75 ± 0,07 ***
	0,5ng sFGFR3	1,77 ± 0,09 #
	5ng sFGFR3	1,81 ± 0,09 #

B

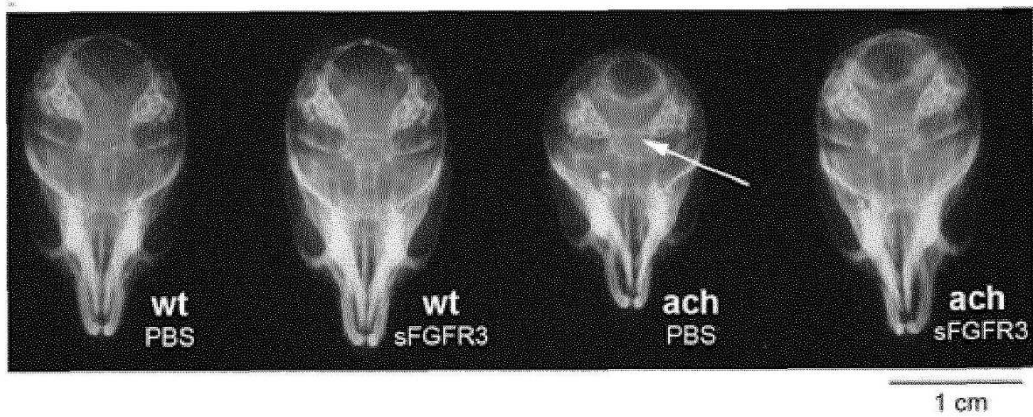


Figura 4