

DETECCIÓN DE ALTO RENDIMIENTO DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS CON LA BAJA ESTATURA

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 63/471,634, presentada el 7 de junio de 2023, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 63/540,792, presentada el 27 de septiembre de 2023, y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 63/564,071, presentada el 12 de marzo de 2024, incorporadas en la presente como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud incluye un listado de secuencias enviado electrónicamente, en un archivo titulado: 58818_Seqlisting.xml creado el 3 de junio de 2024 y que tiene un tamaño de 56.620 bytes, el cual se incorpora como referencia en la presente.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere, en general, al uso de un método de detección de alto rendimiento para identificar mutaciones genéticas en genes, por ejemplo, el gen NPR2, asociado con disfunción del CNP y trastornos de baja estatura.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se pueden realizar métodos para medir la función de miles de secuencias reguladoras candidatas (CRS) utilizando ensayos de reporteros masivamente paralelos (MPRA) (Gordon et al., Nat Protoc. 2020 15(8): 2387–2412).

Muchos genes diferentes están potencialmente asociados con trastornos esqueléticos como la acondroplasia y la baja estatura. La FDA ha aprobado un análogo del péptido natriurético de tipo C (CNP) para la acondroplasia - una forma común de baja estatura. La unión del CNP a su receptor, el receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), desencadena el crecimiento endocondral y esquelético vía la producción de cGMP. Las mutaciones con pérdida de función en NPR2 son responsables del enanismo en ratones y de la ausencia de una respuesta intracelular de cGMP al CNP en condrocitos cultivados.

El NPR2 es un objetivo terapéutico bidireccional asociado con diversas formas de estatura baja y alta. El NPR2 posee actividad de guanililo ciclase, lo que induce la síntesis de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), y la bajorregulación de esta vía es responsable de los fenotipos de estatura baja.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La caracterización de alto rendimiento de las variantes del receptor del péptido natriurético

2 (NPR2) descritas en la presente permite una mejor predicción de nuevas variantes de NPR2 asociadas con la función del CNP y, para aquellas que ocurren más comúnmente, podría beneficiar el diagnóstico y la inscripción en ensayos clínicos para pacientes elegibles que tienen baja estatura.

5 La descripción proporciona un método para identificar un gen variante asociado con baja estatura que es una variante de ganancia de función (GoF) o pérdida de función (LoF) que comprende:

- transfectar células que comprenden un constructo de expresión de reportero de cGMP-GFP con un vector lentiviral que expresa un polinucleótido que codifica una proteína variante asociada con baja estatura operativamente unida a una o más secuencias de código de barras únicas;

- poner en contacto las células en cultivo con el péptido natriurético de tipo C (CNP) o una variante del mismo que tenga actividad de CNP;

- clasificar las células del cultivo con base en el nivel de expresión de GFP producida por la célula; e

- identificar la proteína variante asociada con baja estatura como una variante de GoF o una variante de LoF, en donde una variante de GoF tiene un nivel mayor de producción de cGMP en comparación con un control, y en donde una variante de LoF tiene un nivel menor de producción de cGMP en comparación con un control.

20 En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es colágeno (COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), agregano (ACAN), hedgehog indio (IHH), PTPN11, NPR2, NPPC, FGFR3, receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R), DTL, PAPPA2 o combinaciones de los mismos. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura se selecciona del grupo que consiste en receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), precursor del péptido natriurético C (NPPC), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) o combinaciones de los mismos. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es NPR2.

En la presente también se contempla un método para identificar una variante de NPR2 como una variante de ganancia de función (GoF) o pérdida de función (LoF) que comprende:

30 - transfectar células que comprenden un constructo de expresión de reportero de cGMP-GFP con un vector lentiviral que expresa un polinucleótido que codifica una proteína variante de NPR2 operativamente unida a una o más secuencias de código de barras únicas;

- poner en contacto las células en cultivo con el péptido natriurético de tipo C (CNP) o una variante del mismo que tenga actividad de CNP;

35 - clasificar las células del cultivo con base en el nivel de expresión de GFP producida por la célula; e

- identificar la variante de NPR2 como una variante de GoF o una variante de LoF, en donde una variante de GoF tiene un nivel mayor de producción de cGMP en comparación con

un control, y en donde una variante de LoF tiene un nivel menor de producción de cGMP en comparación con un control.

En diversas modalidades, las células son de una línea celular de mamífero. En ciertas modalidades, las células son células HEK293.

5 En diversas modalidades, las células se clasifican por citometría de flujo.

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende un polinucleótido que codifica un gen variante asociado con baja estatura, un polinucleótido que codifica un gen de resistencia a la puomicina y un polinucleótido que codifica el promotor T2A-BFP.

10 En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende además entre 20 y 60 secuencias de código de barras. En diversas modalidades, las secuencias de código de barras son de 15 a 30 pares de bases.

En diversas modalidades, las secuencias de código de barras están en 3' al polinucleótido del gen variante.

15 En diversas modalidades, el constructo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una proteína GFP operativamente unida a un dominio de unión a cGMP. En diversas modalidades, el dominio de unión a cGMP es de la fosfodiesterasa de ratón o humana.

En diversas modalidades, el constructo de expresión comprende además un promotor de CMV operativamente unido a cGull y un promotor de PGK operativamente unido a un gen de resistencia a la blastocidina.

20 En diversas modalidades, la variante de CNP se selecciona del grupo que consiste en:
 PGQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 1);
 GQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (Gly-CNP-37) (SEQ ID NO: 2);
 GDLRVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (Gly-
 CNP53) (SEQ ID NO: 3);
 25 PDLRVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (Pro-
 CNP53) (SEQ ID NO: 4);
 MDLRVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (Met-
 CNP53) (SEQ ID NO: 5);
 DLRVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSNSGLGC [CNP-
 30 53(M48N)] (SEQ ID NO: 6);
 LRVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (CNP-52)
 (SEQ ID NO: 7);
 RVDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (CNP-51) (SEQ
 ID NO: 8);
 35 VDTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (CNP- 50) (SEQ
 ID NO: 9);
 DTKSRAAWARLLQEHNPARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSMSGLGC (CNP-49) (SEQ ID
 NO: 10);

TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-48) (SEQ ID NO: 11);

KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-47) (SEQ ID NO: 12);

5 SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-46) (SEQ ID NO: 13);

RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-45) (SEQ ID NO: 14);

AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-44) (SEQ ID NO: 15);

10 AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-43) (SEQ ID NO: 16);

WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-42) (SEQ ID NO: 17);

ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 18);

RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-40) (SEQ ID NO: 19);

15 LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID NO: 20);

LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 21);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-37) (SEQ ID NO: 22);

EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-36) (SEQ ID NO: 23);

HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-35) (SEQ ID NO: 24);

20 PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-34) (SEQ ID NO: 25);

NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-33) (SEQ ID NO: 26);

ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-32) (SEQ ID NO: 27);

RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-31) (SEQ ID NO: 28);

KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-30) (SEQ ID NO: 29);

25 YKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-29) (SEQ ID NO: 30);

KGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-28) (SEQ ID NO: 31);

GANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-27) (SEQ ID NO: 32);

ANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-26) (SEQ ID NO: 33);

NKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-25) (SEQ ID NO: 34);

30 KKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-24) (SEQ ID NO: 35);

KGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-23) (SEQ ID NO: 36);

LSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-21) (SEQ ID NO: 37);

SKGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-20) (SEQ ID NO: 38);

KGCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-19) (SEQ ID NO: 39);

35 GCFGLKLDRI SMSGLGC (CNP-18) (SEQ ID NO: 40);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SNSGLGC [CNP-37(M32N)] (SEQ ID NO: 41);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (Pro-CNP-37) (SEQ ID NO: 42);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI SMSGLGC (Met-CNP-37) (SEQ ID NO: 43);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37(M32N)] (SEQ ID NO: 44);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37) (SEQ ID NO: 45);

5 PGQEHPQARRYRGAQRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 46);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 47);

PGQEHPNARRYRGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 48);

PGQEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 49);

GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 50);

10 GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 51);

GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 52); y

GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 53).

En diversas modalidades, el CNP se pone en contacto con las células en una dosis entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM. En diversas modalidades, el CNP se pone en
15 contacto con las células en una dosis de aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85,
20 aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 100 nM.

En diversas modalidades, el lentivirus se transfecta en las células con una multiplicidad de infección de MOI entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5. En diversas modalidades, el lentivirus se transfecta en las células con una multiplicidad de infección de MOI aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4 o
25 aproximadamente 0,5.

En diversas modalidades, la descripción proporciona un vector lentiviral que comprende un polinucleótido que codifica un gen variante asociado con baja estatura, un polinucleótido que codifica un gen de resistencia a la puomicina y un polinucleótido que codifica el promotor T2A-BFP.

30 En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura se selecciona del grupo que consiste en el receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), el precursor del péptido natriurético C (NPPC), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) o combinaciones de los mismos. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es NPR2.

35 Se contempla además un vector lentiviral que comprende un polinucleótido que codifica una variante de NPR2, un polinucleótido que codifica un gen de resistencia a la puomicina y un polinucleótido que codifica el promotor T2A-BFP. En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende además entre 20 y 60 secuencias de código de barras. En diversas modalidades, las

secuencias de código de barras son desde 15 a 30 pares de bases. En diversas modalidades, las secuencias de código de barras están en 3' al polinucleótido del gen variante.

En diversas modalidades, la descripción proporciona un método para elaborar una biblioteca lentiviral que comprende un gen variante asociado con baja estatura, el método comprende:

- amplificar genes variantes asociados con baja estatura a partir de un genoma de mamífero o de una base de datos de ADN genómico;
- clonar las variantes amplificadas en un vector lentiviral, en donde el vector lentiviral comprende entre 20-60 códigos de barras únicos por vector;
- secuenciar la variante asociada con los códigos de barras en el vector;
- alinear las secuencias variantes con una secuencia de gen de control para generar una estructura de lectura;
- extraer los códigos de barras de la estructura de lectura variante;
- identificar los códigos de barras para cada variante; y
- aislar los vectores lentivirales que expresan genes variantes.

En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura se selecciona del grupo que consiste en NPR2, NPPC, FGFR3 o combinaciones de los mismos.

También se proporciona un método para elaborar una biblioteca lentiviral de variantes de NPR2 que comprende

- amplificar variantes de NPR2 a partir de un genoma de mamífero o de una base de datos de ADN genómico;
- clonar las variantes de NPR2 amplificadas en un vector lentiviral, en donde el vector lentiviral comprende entre 20-60 códigos de barras únicos por vector;
- secuenciar la variante de NPR2 asociada con los códigos de barras en el vector;
- alinear las secuencias variantes de NPR2 con una secuencia del gen de NPR2 de control para generar una estructura de lectura;
- extraer los códigos de barras de la estructura de lectura de la variante de NPR2;
- identificar los códigos de barras para cada variante de NPR2; y
- aislar los vectores lentivirales que expresan variantes de NPR2.

La descripción también contempla un método para tratar a un sujeto con un trastorno de baja estatura que comprende administrar una variante de CNP a un sujeto identificado por tener una variante de pérdida de función de un gen asociado con baja estatura identificado utilizando un método descrito en la presente.

En diversas modalidades, la descripción proporciona un método para mejorar y/o mantener la fortaleza ósea en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración de un péptido natriurético de tipo C (CNP) al sujeto. En diversas modalidades, el sujeto tiene un trastorno de baja estatura.

En diversas modalidades, el trastorno de baja estatura se selecciona del grupo que

consiste en acondroplasia, hipocondroplasia, baja estatura, baja estatura idiopática, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatofórica, osteogénesis congénita, acondrogénesis, acondroplasia homocigótica, condrodisplasia congénita, displasia campomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis congénita, síndromes de polidactilia de costillas cortas, tipo rizomélico de condrodisplasia congénita, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia espondiloepifisaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, fémur corto congénito, displasia mesomélica tipo Langer, displasia mesomélica tipo Nievergelt, síndrome de Robinow, síndrome de Reinhardt, acrodisostosis, disostosis periférica, displasia de Kniest, fibrocondrogénesis, síndrome de Roberts, displasia acromesomélica, micromelia, síndrome de Morquio, síndrome de Kniest, displasia metatrófica y displasia espondiloepimetafisaria, trastornos relacionados con la mutación NPR2, mutaciones SHOX, síndrome de Turner/Leri Weill, mutaciones PTPN11, síndrome de Noonan y mutación IGF1R.

La descripción también contempla un modelo PK poblacional para la dosificación de una variante de CNP a un sujeto. En diversas modalidades, la descripción proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con los huesos sensible al CNP, displasia esquelética o trastorno de baja estatura, que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una variante de CNP, en donde la variante de CNP se administra de acuerdo con un régimen de dosificación por banda de peso, en donde

- i) un sujeto entre 10-11 kg recibe entre aproximadamente 22-24 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- ii) un sujeto entre 12-16 kg recibe entre aproximadamente 18-23 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- iii) un sujeto entre 17-21 kg recibe entre aproximadamente 15-19 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- iv) un sujeto entre 22-32 kg recibe entre aproximadamente 13-18 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- v) un sujeto entre 33-43 kg recibe entre aproximadamente 12-15 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- vi) un sujeto entre 44-59 kg recibe entre aproximadamente 10-14 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP;
- vii) un sujeto entre 60-89 kg recibe entre aproximadamente 8-12 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP; o
- viii) un sujeto con peso ≥ 90 kg recibe aproximadamente ≤ 9 $\mu\text{g/kg}$ de variante de CNP.

En diversas modalidades,

- i) un sujeto entre 10-11 kg recibe aproximadamente 0,24 mg de variante de CNP;
- ii) un sujeto entre 12-16 kg recibe aproximadamente 0,28 mg de variante de CNP;
- iii) un sujeto entre 17-21 kg recibe aproximadamente 0,32 mg de variante de CNP;
- iv) un sujeto entre 22-32 kg recibe aproximadamente 0,40 mg de variante de CNP;

- v) un sujeto entre 33-43 kg recibe aproximadamente 0,50 mg de variante de CNP;
- vi) un sujeto entre 44-59 kg recibe aproximadamente 0,60 mg de variante de CNP;
- vii) un sujeto entre 60-89 kg recibe aproximadamente 0,7 mg de variante de CNP; o
- viii) un sujeto que tiene un peso ≥ 90 kg recibe aproximadamente 0,80 mg de variante de

5 CNP.

En diversas modalidades, el trastorno relacionado con los huesos sensible al CNP, la displasia esquelética o el trastorno de baja estatura se seleccionan del grupo que consiste en acondroplasia, hipocondroplasia, baja estatura, baja estatura idiopática, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatofórica, osteogénesis congénita, acondrogénesis, 10 acondroplasia homocigótica, condrodisplasia congénita, displasia campomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis congénita, síndromes de polidactilia de costillas cortas, tipo rizomélico de condrodisplasia congénita, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia espondiloepifisaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, fémur corto congénito, displasia mesomélica tipo Langer, displasia mesomélica tipo Nievergelt, síndrome de 15 Robinow, síndrome de Reinhardt, acrodisostosis, disostosis periférica, displasia de Kniest, fibrocondrogénesis, síndrome de Roberts, displasia acromesomélica, micromelia, síndrome de Morquio, síndrome de Kniest, displasia metatrófica y displasia espondiloepimetafisaria, trastornos relacionados con la mutación NPR2, mutaciones SHOX, síndrome de Turner/Leri Weill, mutaciones PTPN11, síndrome de Noonan y mutación IGF1R.

20 En diversas modalidades, la variante de CNP se describe en las SEQ ID NOs: 1-53. En diversas modalidades, la variante de CNP es

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 1); GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP-37) (SEQ ID NO: 2); o LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 21).

25 En diversas modalidades, la variante de CNP comprende además una porción hidrofílica. En diversas modalidades, la porción hidrofílica es PEG.

También se contempla un constructo de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una proteína GFP, operativamente unido a un dominio de unión a cGMP, como se describe en la presente, útil en un ensayo de reportero, como se describe en la presente. El 30 dominio de unión a cGMP es de la fosfodiesterasa de ratón o humana. En diversas modalidades, el constructo de expresión comprende además un promotor de CMV, operativamente unido a cGull, y un promotor de PGK operativamente unido a un gen de resistencia a la blastocidina.

Los expertos en la materia apreciarán otros aspectos y ventajas a partir de la siguiente descripción detallada, junto con las Figuras. Si bien las composiciones, artículos y métodos 35 pueden implementarse de diversas formas, la descripción que sigue incluye implementaciones específicas, entendiéndose que la descripción es ilustrativa y no pretende limitar la invención a las modalidades específicas descritas en la presente. Para las composiciones, artículos y métodos descritos en la presente, se contempla la selección de características opcionales,

incluyendo, pero no limitado a, componentes, rangos de composición, sustituyentes, condiciones y pasos, entre los diversos aspectos, implementaciones y ejemplos proporcionados en la presente.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Las Figuras 1A-1D representan un esquema de un proceso de detección de alto rendimiento utilizando un lentivirus que expresa NPR2 y un constructo de reportero de cGMP. Figura 1A. Constructo de lentivirus bidireccional que expresa NPR2 y puro-T2A-BFP. Figura 1B. Reportero fluorescente de GFP sensible a cGMP reconstituido en células HEK293s. Figura 1C. Estrategia de código de barras y métodos basados en PacBio (lectura larga) e Illumina (lectura corta) para asociar el código de barras a la variante. Figura 1D. Estrategia de detección basada en la clasificación de GFP.

La Figura 2 ilustra un método para generar una biblioteca lentiviral de variante de NPR2.

Las Figuras 3A-3B muestran los niveles de cGMP detectados por el ensayo de punto de captura (Figura 3A) o el constructo del reportero de cGMP-GFP de la descripción (Figura 3B).

Las Figuras 4A-4C muestran el proceso de detección de muestras usando generación de PCR de variantes de NPR2 (Figura 4A), detección donde las funciones LoF o GoF tendrán diferentes niveles de producción de cGMP (Figura 4B) y los resultados de una detección del reportero de cGMP-GFP en una variante de NPR2 de GoF o LoF (Figura 4C).

La Figura 5 muestra una clasificación de muestra representativa del análisis citométrico de flujo de una detección de GFP alta o GFP baja, y demuestra que la detección es altamente correlativa con la función de la variante de NPR2 y la expresión de cGMP-GFP.

Las Figuras 6A-6B muestran que la detección de alto rendimiento que utiliza el constructo cGMP-GFP (Figura 6A) se correlaciona con resultados publicados previamente de la función de la variante de NPR2 (Figura 6B).

Las Figuras 7A-7C muestran la actividad funcional de las variantes por consecuencias genéticas y efectos fenotípicos. Figura 7A. Niveles de cGMP medidos por la consecuencia funcional de las variantes. Figura 7B. Las predicciones de Varsity ER LOO pueden discriminar parcialmente entre variantes sin sentido que alteran la función de NPR2. Figura 7C. Comparación de las mediciones de cGMP de detección de bibliotecas vs. el efecto sobre la estatura adulta humana en UKBiobank.

Las Figuras 8A-8B muestran una baja estimulación de CNP y se identificaron 7 variantes de GoF que no estaban presentes en la detección de alto CNP (Figura 8A). Además, se observó una variante constitutivamente activa en el estudio de detección sin estimulación de CNP (Figura 8B).

Las Figuras 9A-9B muestran que las puntuaciones poligénicas de la estatura modifican el efecto de las variantes de NPR2. La Figura 9A muestra cómo varía la estatura adulta por la puntuación poligénica en personas que informaron baja estatura a los 10 años. Figura 9B. Se

entrenó un modelo de regresión logística para predecir la baja estatura adulta en personas que informaron baja estatura a los 10 años. Las variables independientes incluyeron la presencia de una variante de NPR2 con actividad reducida y únicamente la puntuación poligénica. Este modelo simple puede predecir 2/3 de los verdaderos positivos, manteniendo una tasa de falsos positivos por debajo de 20%.

La Figura 10 muestra la secuencia de la proteína NPR2 humana.

La Figura 11 proporciona una tabla de las variantes de NPR2 detectadas.

La Figura 12 muestra gráficas de bondad de ajuste para el modelo PPK final.

La Figura 13 muestra los resultados de VPC normalizados por dosis para el modelo PPK; concentraciones de vosoritida observadas y simuladas normalizadas por dosis versus el tiempo después de la primera dosis.

La Figura 14 muestra valores de AUC de vosoritida simulados en comparación con los valores de AUC observados a 15 µg/kg del estudio 111-301.

La Figura 15 muestra valores simulados de $C_{\text{máx}}$ de vosoritida en comparación con los valores de $C_{\text{máx}}$ observados a 15 µg/kg del estudio 111-301.

La Figura 16A muestra el área cortical metacarpiana (mm²) en cada punto temporal del tratamiento. La Figura 16B muestra la robustez metacarpiana (mm) en cada punto temporal del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El CNP se dirige al receptor NPR2 y simula una transducción de señales que produce señales que estimulan el crecimiento óseo. Esta caracterización de alto rendimiento de las variantes de NPR2, descrita en la presente, permite una mejor predicción de nuevas variantes. En el caso de las mutaciones más comunes, el método podría beneficiar el diagnóstico y la inclusión en ensayos clínicos de pacientes elegibles.

Los métodos de detección anteriores (por ejemplo, el ensayo de punto de captura) requerían más de un año de esfuerzo para caracterizar ~160 variantes. La actual estrategia de detección basada en bibliotecas presenta diversas ventajas, entre ellas un mayor rendimiento (por ejemplo, detección simultánea de >400-1000 variantes en meses) y una mayor calidad y reproducibilidad de los datos (por ejemplo, aumento de las réplicas).

Como se utilizan en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, los artículos indefinidos "un" y "uno" y el artículo definido "el" incluyen referentes tanto plurales como singulares a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un error aceptable para un valor particular, determinado por un experto en la materia, que depende en parte de cómo se mide o determina dicho valor. En ciertas modalidades, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una desviación estándar de 1, 2, 3 o 4. En ciertas modalidades, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a una desviación estándar del 30%,

25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,05% de un valor o rango dado. Siempre que el término "alrededor de" o "aproximadamente" preceda al primer valor numérico de una serie de dos o más valores numéricos, se entiende que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se aplica a cada uno de los valores numéricos de esa serie.

5 "Amplificación" se refiere a cualquier medio por el cual una secuencia de polinucleótidos se copia y, por lo tanto, se expande en un mayor número de moléculas de polinucleótidos, *por ejemplo*, por transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa.

10 "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria.

En la presente se utiliza la notación convencional para describir las secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de polinucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de nucleótidos de 5' a 3' a los transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN con la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias de la cadena de ADN con la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN, ubicadas entre el extremo 5' y el 5' del transcrito de ARN, se denominan "secuencias cadena arriba"; las secuencias de la cadena de ADN con la misma secuencia que el ARN, ubicadas entre el extremo 3' y el 3' del transcrito de ARN codificante, se denominan "secuencias cadena abajo".

"Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o coincidencia de las superficies interactuantes de dos polinucleótidos. Por lo tanto, las dos moléculas pueden describirse como complementarias y, además, las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario de un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es idéntica a la secuencia de nucleótidos del socio de unión del segundo polinucleótido. Por lo tanto, el polinucleótido cuya secuencia es 5'-TATAC-3' es complementario de un polinucleótido cuya secuencia es 5'-GTATA-3'. Una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente complementaria" a una secuencia de nucleótidos de referencia si la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos en cuestión es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de referencia.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (*es decir*, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y suele proporcionarse en los listados de secuencias, como la

cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción, de un gen o ADNc pueden considerarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. Salvo que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que

5 codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

"Secuencia de control de expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos en un polinucleótido que regula la expresión (transcripción y/o traducción) de una secuencia de nucleótidos operativamente unida a este. "Operativamente unida" u "operablemente unida" se

10 refiere a una relación funcional entre dos partes en la que la actividad de una parte (*por ejemplo*, la capacidad de regular la transcripción) resulta en una acción sobre la otra parte (*por ejemplo*, la transcripción de la secuencia). Las secuencias de control de expresión pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, secuencias de promotores (*por ejemplo*, inducibles o constitutivos), potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (*es decir*, ATG), señales de

15 empalme para intrones y codones de terminación.

El término "promotor", como se utiliza en la presente, se refiere a una región de ADN que controla la transcripción de una o más secuencias de ADN y que se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente de ADN y otras secuencias de ADN que interactúan para regular la función del promotor. Un fragmento promotor

20 de expresión funcional de un promotor es una secuencia promotora acortada o troncada que conserva la actividad del promotor. La actividad del promotor puede medirse mediante cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de reportero utilizando luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, o mediante reporteros disponibles comercialmente.

El término "vector" se refiere a cualquier portador de ADN o ARN exógeno que sea útil para transferir ADN exógeno a una célula huésped para su replicación o expresión adecuada. "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante con secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión contiene suficientes elementos cis para la

30 expresión; otros elementos para la expresión pueden ser aportados por la célula huésped o un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, como vectores virales, cósmidos y plásmidos (*por ejemplo*, desnudos o contenidos en liposomas), que incorporan el polinucleótido recombinante.

Un "vector viral" se refiere a un vector que utiliza una estructura viral para transportar un

35 casete de expresión de polinucleótidos. Los vectores virales incluyen vectores lentivirales, vectores adenovirales o vectores adenoasociados (AAV).

Un "casete de expresión" o "casete" se refiere a un componente del ADN del vector o plásmido que controla la expresión de un gen o proteína, y puede ser intercambiable y fácil de

insertar o extraer del vector. Los casetes de expresión suelen comprender una secuencia promotora, un marco de lectura abierto y una región 3' no traducida que contiene un sitio de poliadenilación.

"Polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto por unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos naturales, como el ácido desoxirribonucleico ("ADN"), incluyendo el ADNc, y el ácido ribonucleico ("ARN"), así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que contienen bases no naturales, nucleótidos que se unen con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster natural o que incluyen bases unidas mediante enlaces distintos de los enlaces fosfodiéster. Por lo tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosfortriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metilribonucleótidos, ácidos peptídico-nucleicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante un sintetizador de ADN automatizado. El término "ácido nucleico" se refiere típicamente a polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, generalmente de no más de 50 nucleótidos. Se entiende que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T".

"Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales naturales relacionadas y análogos sintéticos no naturales de los mismos, unidos mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante un sintetizador automático de polipéptidos. El término "proteína" se refiere típicamente a polipéptidos grandes. El término "péptido" se refiere típicamente a polipéptidos cortos. En la presente, se utiliza la notación convencional para representar secuencias polipeptídicas: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino terminal; el extremo derecho es el extremo carboxilo terminal.

Un "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido con secuencias que no se unen de forma natural. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede incluirse en un vector adecuado, y este puede utilizarse para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que contiene el polinucleótido recombinante se denomina "célula huésped recombinante". El gen se expresa entonces en la célula huésped recombinante para producir, *por ejemplo*, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante también puede desempeñar una función no codificante (*por ejemplo*, promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.). Una proteína recombinante se refiere a una proteína codificada por un polinucleótido recombinante.

El término "código de barras" se refiere a una etiqueta de nucleótidos corta que se añade a una secuencia de polinucleótidos de interés durante la preparación de una biblioteca de ADN para proporcionar información sobre un polinucleótido específico al que se añade el código de

barras o sobre la célula en la que se puede expresar el polinucleótido de interés. Un código de barras puede tener entre 10 a 30 pares de bases (pb) de longitud, o 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases. Se pueden añadir diversos códigos de barras a un polinucleótido de interés.

5 El término "biblioteca de polinucleótidos" o "biblioteca" se refiere a un conjunto de fragmentos de polinucleótidos clonados en vectores de expresión para identificarlos y aislar uno o más genes de interés. La biblioteca de polinucleótidos puede ser de ARN o ADN, incluyendo ADN genómico o ADNc.

10 El término "péptido natriurético de tipo C" o "CNP" se refiere a un péptido pequeño de cadena sencilla con una estructura de bucle de 17 aminoácidos en el extremo C-terminal (No. de acceso a GenBank: NP_077720, para la proteína precursora de CNP, NPPC) y sus variantes. La estructura de bucle de CNP de 17 meros también se conoce como CNP 17, anillo de CNP o dominio cíclico de CNP. El CNP incluye el péptido activo de 53 aminoácidos (CNP-53) y el péptido maduro de 22 aminoácidos (CNP-22), así como péptidos de longitudes variables entre dos
15 péptidos.

En diversas modalidades, una "variante de CNP" es al menos aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% homologa al NPPC de tipo silvestre en el mismo número de residuos de aminoácidos. Se contempla además que un péptido variante de CNP puede comprender desde aproximadamente 1 a aproximadamente 53, o 1 a 39, o 1 a 38, o 1 a
20 37, o 1 a 35, o 1 a 34, o 1 a 31, o 1 a 27, o 1 a 22, o 10 a 35, o aproximadamente 15 a aproximadamente 37 residuos del polipéptido NPPC. En una modalidad, una variante de CNP puede comprender una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 o 53 aminoácidos derivados del polipéptido NPPC. La variante de
25 CNP también incluye conjugados, sales o profármacos de las variantes de CNP descritas en la presente. La "terapia con CNP" se refiere a la administración de una variante de CNP para tratar a un sujeto que tiene un trastorno óseo, displasia esquelética o baja estatura, como se describe en la presente.

El término "porción conjugada" se refiere a una porción conjugada con el péptido variante.
30 Las porciones conjugadas incluyen un lípido, un ácido graso, un espaciador hidrofílico, un polímero sintético, un enlazador u, opcionalmente, combinaciones de los mismos.

"Tratamiento" se refiere a un tratamiento profiláctico, terapéutico o diagnóstico. En ciertas modalidades, "tratamiento" se refiere a la administración de un compuesto o composición a un sujeto con fines terapéuticos, profilácticos o diagnósticos.

35 Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o que únicamente presenta signos tempranos de la misma, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos o composiciones de la descripción pueden administrarse como tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de

desarrollar una patología o para minimizar su gravedad, si se desarrolla.

Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas patológicos con el fin de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales o físicos, subjetivos u objetivos. Los compuestos de la descripción también pueden administrarse como tratamiento terapéutico o para fines diagnósticos.

"Diagnóstico" significa identificar la presencia, la extensión y/o la naturaleza de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en su especificidad y selectividad. Si bien un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, basta con que proporcione una indicación positiva que facilite el diagnóstico.

"Composición farmacéutica" o "formulación" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en animales, incluyendo humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una variante de CNP, opcionalmente otro agente biológicamente activo y, opcionalmente, un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, una composición farmacéutica comprende una composición que comprende los ingredientes activos y los ingredientes inertes que componen el portador, así como cualquier producto resultante, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de dos o más ingredientes, o de la disociación de uno o más ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más ingredientes.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción abarcan cualquier composición elaborada mezclando un compuesto de la descripción y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

"Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los portadores, amortiguadores y similares farmacéuticos estándar, como una solución salina amortiguada con fosfato, una solución acuosa de dextrosa al 5% y emulsiones (por ejemplo, una emulsión de aceite/agua o agua/aceite). Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen adyuvantes, aglutinantes, rellenos, diluyentes, desintegrantes, agentes emulsionantes, agentes humectantes, lubricantes, deslizantes, edulcorantes, agentes saborizantes y agentes colorantes. Los portadores, aromatizantes y diluyentes farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19.^a ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los portadores farmacéuticos preferidos dependen del modo de administración previsto del agente activo. Los modos de administración típicos incluyen la administración enteral (*por ejemplo*, oral) o parenteral (*por ejemplo*, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica o transmucosa).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede formularse en un compuesto para uso farmacéutico, incluyendo, pero no limitado a, sales metálicas (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un

material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable, es *decir*, el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable o sin interactuar de manera perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido o con cualquier componente presente en el cuerpo del individuo.

5 “Condiciones fisiológicas” se refieren a las condiciones corporales de un animal (por ejemplo, un ser humano). Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a, la temperatura corporal y un entorno acuoso con fuerza iónica fisiológica, pH y enzimas. También abarcan condiciones corporales de un sujeto en particular que difieren de las condiciones “normales” presentes en la mayoría de los sujetos, por ejemplo, que difieren de la temperatura corporal
10 humana normal de aproximadamente 37°C o del pH sanguíneo humano normal de aproximadamente 7,4.

Por “pH fisiológico” o “pH en un rango fisiológico” se entiende un pH en el rango de aproximadamente 7,0 a 8,0 inclusive, más típicamente en el rango de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

15

Variantes del péptido natriurético de tipo C

El péptido natriurético de tipo C (CNP) (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990) (No. de acceso de GenBank NP_077720, para la proteína precursora de CNP, NPPC) (J. Hypertens., 10: 907-912 (1992)) es un péptido pequeño de cadena única en una familia de
20 péptidos (ANP, BNP, CNP) que tiene una estructura de bucle de 17 aminoácidos (Levin et al., N. Engl. J. Med., 339: 863-870 (1998)) y tiene funciones importantes en múltiples procesos biológicos. El CNP interactúa con el receptor del péptido natriurético B (NPR-B, GC-B, NPR2) para estimular la generación de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (J. Hypertens., 10: 1111-1114 (1992)). El CNP se expresa más ampliamente, incluso en el sistema nervioso central,
25 el tracto reproductivo, los huesos y el endotelio de los vasos sanguíneos (Hypertension, 49: 419-426 (2007)).

En los seres humanos, el CNP se produce inicialmente a partir del gen precursor del péptido natriurético C (NPPC) como un polipéptido pre-pro de cadena única de 126 aminoácidos (Sudoh et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990)). La eliminación del
30 péptido señal produce pro-CNP y una escisión posterior por la endoproteasa. La furina genera un péptido activo de 53 aminoácidos (CNP-53), que es secretado y escindido de nuevo por una enzima desconocida para producir el péptido maduro de 22 aminoácidos (CNP-22) (Wu, J. Biol. Chem. 278: 25847-852 (2003)). El CNP-53 y el CNP-22 difieren en su distribución, predominando el CNP-53 en los tejidos, mientras que el CNP-22 está principalmente en el plasma y el líquido
35 cefalorraquídeo (J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res., 26: 269-297 (2006)). Tanto el CNP-53 como el CNP-22 se unen de forma similar a NPR-B.

La señalización cadena abajo mediada por la generación de cGMP influye en diversos procesos biológicos, incluida la osificación endocondral. Por ejemplo, la inactivación de CNP o

NPR-B en modelos murinos da como resultado animales con un fenotipo enano, con huesos largos y vértebras más cortos. Se han identificado mutaciones en el NPR-B humano que bloquean la señalización adecuada de CNP y que resultan en enanismo (Olney *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 91(4): 1229-1232 (2006); Bartels *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 75: 27-34 (2004)).

- 5 Por el contrario, los ratones modificados genéticamente para producir niveles elevados de CNP presentan huesos largos y vértebras alargados.

El gen y el polipéptido CNP natural se han descrito previamente. La Patente de Estados Unidos No. 5.352.770 describe el CNP-22 aislado y purificado de cerebro porcino, con una secuencia idéntica a la del CNP humano, y su uso en el tratamiento de afecciones
10 cardiovasculares. La Patente de Estados Unidos No. 6.034.231 describe el gen y el polipéptido humanos del pre-proCNP (126 aminoácidos), así como el gen y el polipéptido CNP-53 humano. El CNP maduro es un péptido de 22 aminoácidos (CNP-22). Ciertas variantes del CNP se describen en la Patente de Estados Unidos No. 8.198.242, incorporada como referencia en la presente.

- 15 En diversas modalidades, el CNP de la descripción incluye CNP truncado que abarca desde el CNP-17 humano (hCNP-17) hasta el CNP-53 humano (hCNP-53), y que tiene secuencias de aminoácidos de tipo silvestre derivadas del hCNP-53, así como variantes del mismo. Dichos péptidos de CNP truncados incluyen:

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 1);
20 GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Gly-CNP-37) (SEQ ID NO: 2);
GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Gly-CNP53) (SEQ ID NO: 3);
PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Pro-CNP53) (SEQ ID NO: 4);
25 MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-CNP53) (SEQ ID NO: 5);
DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSNSGLGC [CNP-53(M48N)] (SEQ ID NO: 6);
LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-52)
30 (SEQ ID NO: 7);
RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-51) (SEQ ID NO: 8);
VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP- 50) (SEQ ID NO: 9);
35 DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-49) (SEQ ID NO: 10);
TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-48) (SEQ ID NO: 11);

- KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-47) (SEQ ID NO: 12);
- SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-46) (SEQ ID NO: 13);
- 5 RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-45) (SEQ ID NO: 14);
- AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-44) (SEQ ID NO: 15);
- AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-43) (SEQ ID NO: 16);
- 10 WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-42) (SEQ ID NO: 17);
- ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 18);
- RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-40) (SEQ ID NO: 19);
- LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID NO: 20);
- LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 21);
- 15 QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (SEQ ID NO: 22);
- EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-36) (SEQ ID NO: 23);
- HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-35) (SEQ ID NO: 24);
- PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34) (SEQ ID NO: 25);
- NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-33) (SEQ ID NO: 26);
- 20 ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-32) (SEQ ID NO: 27);
- RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-31) (SEQ ID NO: 28);
- KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-30) (SEQ ID NO: 29);
- YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-29) (SEQ ID NO: 30);
- KGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-28) (SEQ ID NO: 31);
- 25 GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-27) (SEQ ID NO: 32);
- ANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-26) (SEQ ID NO: 33);
- NKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-25) (SEQ ID NO: 34);
- KKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-24) (SEQ ID NO: 35);
- KGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-23) (SEQ ID NO: 36);
- 30 LSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-21) (SEQ ID NO: 37);
- SKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-20) (SEQ ID NO: 38);
- KGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-19) (SEQ ID NO: 39);
- GCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-18) (SEQ ID NO: 40);
- QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)] (SEQ ID NO: 41);
- 35 PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37) (SEQ ID NO: 42);
- MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37) (SEQ ID NO: 43);
- GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37(M32N)] (SEQ ID NO: 44);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37) (SEQ ID NO: 45);

PGQEHPQARRYRGAQRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 46);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 47);

5 PGQEHPNARRYRGANRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 48); y

PGQEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 49).

En diversas modalidades, los péptidos variantes de CNP son péptidos CNP-37 o CNP-38 modificados, que opcionalmente presentan mutaciones/sustituciones en el sitio de escisión de la furina y/o contienen glicina o prolina-glicina en el extremo aminoterminal. Las variantes de CNP-

10 37 ejemplares incluyen, pero no se limitan a:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSNSGLGC [CNP-37(M32N); SEQ ID NO: 41];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-CNP-37; SEQ ID NO: 43);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; SEQ ID NO: 42);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSNSGLGC [Gly-CNP-37 (M32N); SEQ ID NO:

15 44];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37; SEQ ID NO:1);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37; SEQ ID NO: 45);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Gly-CNP-37: SEQ ID NO: 2)

20 GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 50);

GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 51);

GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 52); y

GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 53);

En diversas modalidades, las variantes de CNP de la descripción incluyen

25 PGQEHPQARRYRGAQRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 46);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 47);

PGQEHPNARRYRGANRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 48); o

PGQEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 49).

El péptido variante puede comprender además un grupo acetilo. En diversas modalidades, el grupo acetilo está en el extremo N-terminal del péptido. En diversas modalidades, el péptido comprende además un grupo OH o NH₂ en el extremo C-terminal.

30

El péptido variante puede comprender una porción conjugada. En diversas modalidades, la porción conjugada está en un residuo del dominio cíclico del CNP o en un sitio distinto del dominio cíclico del CNP. En diversas modalidades, la porción conjugada está en un residuo de lisina. En diversas modalidades, la porción conjugada comprende una o más porciones ácidas. En diversas modalidades, la porción ácida es un ácido hidrofóbico.

35

En diversas modalidades, la variante tiene la estructura: PGQEHPQARRYRGAQRRGLSRGCFGLK(AEEA-AEEA-γGlu-C18DA)LDRIGSMSGLGC (SEQ

ID NO: 46), o Ac-PGQEHQPARRYRGAQRRGLSRGCFGLK(AEEA-AEEA-γGlu-C18DA)LDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 46).

En diversas modalidades, la variante se selecciona del grupo que consiste en Ac-PGQEHQPARRYRGAQRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 46);
 5 Ac-PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC-NH₂ (SEQ ID NO: 47);
 Ac-PGQEHPNARRYRGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 48);
 Ac-PGQEHPNARRYRGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC-NH₂ (SEQ ID NO: 48);
 Ac-PGQEHQPARRYRGAQRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC-NH₂ (SEQ ID NO: 46);
 Ac-PGQEHQPARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC-NH₂ (SEQ ID NO: 49); y
 10 Ac-PGQEHQPARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 49).

En diversas modalidades, la variante de CNP es Ac-PGQEHQPARRYRGAQRRGLSRGCFGLK(AEEA-AEEA-γGlu-C18DA)LDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 46). En diversas modalidades, la variante de CNP es Ac-PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLK(AEEA-AEEA-γGlu-C18DA)LDRIGSMSGLGC-OH
 15 (SEQ ID NO: 47). En diversas modalidades, la variante de CNP es PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLK(AEEA-AEEA-γGlu-C18DA)LDRIGSMSGLGC-OH (SEQ ID NO: 47).

Se contempla además que la variante de CNP esté conjugada o complejada con una porción, por ejemplo, una porción conjugada, que confiere mayor estabilidad o vida media. En
 20 diversas modalidades, la porción conjugada se compleja mediante un enlace no covalente o se une mediante un enlace covalente. La porción puede estar unida no covalentemente al péptido mediante interacciones electrostáticas. Alternativamente, la porción puede estar asociada covalentemente al péptido mediante una o más porciones enlazadoras. Los enlazadores pueden ser enlazadores escindibles y no escindibles. Los enlazadores escindibles pueden escindirse
 25 mediante enzimas, reactivos nucleofílicos/básicos, agentes reductores, fotoirradiación, reactivos electrófilos/ácidos, reactivos organometálicos y metálicos, o reactivos oxidantes. Los enlazadores también pueden ser autoinmolativos. Los enlazadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales
 30 como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno), beta-alanina, ácido 4-aminobutírico (GABA), ácido 2-aminoetoxi (AEA), ácido aminoetoxi-2-etoxi acético (AEEA),
 35 ácido 5 aminovalérico (AVA), ácido 6-aminocaproico (Abx), un enlazador escindible de diol vecinal, lactonización de bloqueo de trimetilo, carbamato de p-alcoxifenilo, bicina, enlazadores de tipo peptoide o bicina y enlazadores electrónicos como se describe en la presente.

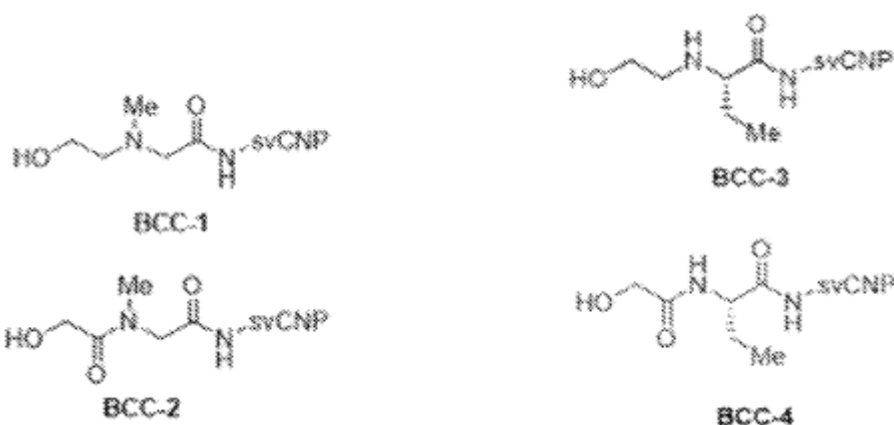
Se contempla que el enlazador esté unido a un residuo de la variante de CNP dentro del

dominio cíclico de CNP o en un sitio distinto del dominio cíclico de CNP. En diversas modalidades, el enlazador está unido a un residuo de lisina. En diversas modalidades, el enlazador está unido a un residuo de lisina en el dominio cíclico de CNP.

En diversas modalidades, la variante de CNP se une a la porción conjugada mediante el enlazador. En diversas modalidades, el enlazador se une a la porción conjugada mediante el espaciador hidrofílico de la porción conjugada.

En diversas modalidades, el enlazador es un enlazador hidrolizable.

En diversas modalidades, el enlazador es un peptoide o un enlazador electrónico. En diversas modalidades, el enlazador es un peptoide. En diversas modalidades, el enlazador es un enlazador electrónico. En diversas modalidades, el enlazador comprende una porción SO_2 . En la Figura 7 se ilustran ejemplos de enlazadores. Se contempla además que los enlazadores de la Figura 7 se modifiquen mediante sustitución en los grupos R. Por ejemplo, los enlazadores de tipo bicina incluyen las estructuras que se detallan a continuación:



En diversas modalidades, la porción conjugada al péptido es un polímero sintético como polietilenglicol, un enlazador, una porción lipídica o un ácido graso, o una combinación de los mismos. En diversas modalidades, la variante de CNP se conjuga con un ácido graso, un aminoácido, un espaciador y un enlazador. En diversas modalidades, la variante de CNP se conjuga con un ácido graso, un aminoácido, un espaciador de polietilenglicol o un espaciador derivado de polietilenglicol, y un enlazador. En diversas modalidades, la variante de CNP se conjuga con un ácido graso, un aminoácido, un espaciador y un enlazador, donde el espaciador comprende una cadena alquílica sustituida de C-6 a C-20 o cualquier aminoácido, o una combinación de ambos, donde los átomos de carbono de la cadena alquílica pueden reemplazarse por uno o más grupos O, NH, N(alquilo C-1 a C-6) o carbonilo.

En diversas modalidades, la variante de CNP se conjuga con un ácido graso. Se plantea la hipótesis de que la tecnología lipídica aumenta la semivida sérica de la variante de CNP, lo que permite inyecciones menos frecuentes o una mejor administración oral. En diversas modalidades, el ácido graso es de cadena corta, media o larga, o dicarboxílico. En diversas modalidades, el ácido graso es saturado o insaturado. En diversas modalidades, el ácido graso es un ácido graso de C-6 a C-20. En diversas modalidades, el ácido graso es un ácido graso de

C-6, C-8, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18 o C-20. En diversas modalidades, el ácido graso es decanoico, dodecanoico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico o diácidos de los mismos. En diversas modalidades, el ácido graso se conjuga con un residuo de lisina.

En diversas modalidades, se contempla que las variantes de CNP descritas en la presente comprendan una porción conjugada, como se describe en la presente. Se contempla que la porción conjugada esté en un residuo del dominio cíclico de CNP o en un sitio distinto del dominio cíclico de CNP. En diversas modalidades, la porción conjugada está en un residuo de lisina. En diversas modalidades, la porción conjugada comprende una o más porciones ácidas. En diversas modalidades, la porción ácida es un ácido graso. Se describen ejemplos de variantes de CNP y conjugados peptídicos en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2020/051100 y USSN 17/642,150, incorporadas en la presente como referencia en su totalidad. Las variantes, conjugados y sales de CNP se describen en USSN 17/634,034, incorporada en la presente como referencia.

En diversas modalidades, la porción conjugada comprende una porción ácida unida a un espaciador hidrofílico. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-6 a C-20 o cualquier aminoácido, o una combinación de ambos, donde los átomos de carbono de la cadena alquílica pueden reemplazarse por uno o más de: O, NH, N(alquilo C-1 a C-6) o carbonilo. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es cualquier aminoácido. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es ácido gamma glutámico (γ Glu). En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-6 a C-20. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-6, C-8, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18 o C-20. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-9 a C-18. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-18. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es una cadena alquílica sustituida de C-9. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es uno o más grupos OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico). En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es uno o dos grupos OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico). En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico). En diversas modalidades, el espaciador es OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico) o γ Glu. En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es ácido gamma glutámico (γ Glu) unido a uno o más grupos OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico). En diversas modalidades, el espaciador hidrofílico es ácido gamma glutámico (γ Glu) unido a uno o dos grupos OEG (ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico) (diEG). En diversas modalidades, la porción ácida y el espaciador hidrofílico tienen la estructura AEEA-AEEA- γ Glu-C18DA.

En diversas modalidades, la descripción contempla el uso de variantes de CNP que comprenden polímeros hidrofílicos o solubles en agua (por ejemplo, cadenas de alquilo oxigenadas, en donde los átomos de carbono pueden reemplazarse con uno o más átomos de oxígeno, como polietilenglicol (PEG) u óxido de polietileno (PEO) y similares). En diversas

modalidades, los polímeros solubles en agua pueden variar en tipo (por ejemplo, homopolímero o copolímero; copolímero aleatorio, alterno o en bloque; lineal o ramificado; monodisperso o polidisperso), enlace (por ejemplo, enlace hidrolizable o estable como, por ejemplo, enlace amida, imina, amina, alquileo o éster), sitio de conjugación (por ejemplo, en el extremo terminal N, interno y/o extremo terminal C) y longitud (por ejemplo, de aproximadamente 0,2, 0,4 o 0,6 kDa a aproximadamente 2, 5, 10, 25, 50 o 100 kDa). El polímero hidrofílico o soluble en agua se puede conjugar con la variante de CNP mediante química basada en N-hidroxi succinimida (NHS) o aldehído u otra química, como se conoce en la técnica. En diversas modalidades, las variantes de PEG-CNP con carga negativa se pueden diseñar para una depuración renal reducida, incluyendo, pero no limitado, al uso de compuestos carboxilados, sulfatados y fosforilados (Caliceti, Adv. Drug Deliv. Rev., 55: 1261-77 (2003); Perlman, J. Clin. Endo. Metab., 88: 3227-35 (2003); Pitkin, Antimicrob. Ag. Chemo., 29: 440-444 (1986); Vehaskari, Kidney Int'l, 22: 127-135 (1982)). En una modalidad, la porción PEG (o PEO) contiene uno o más grupos carboxilo, uno o más grupos sulfato y/o uno o más grupos fosfato.

En otra modalidad, las porciones de polímero hidrofílico (por ejemplo, PEG o PEO) conjugadas con el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o los sitios internos de las variantes de CNP descritas en la presente contienen uno o más grupos funcionales con carga positiva en condiciones fisiológicas. Dichas porciones están diseñadas, *entre otras cosas*, para mejorar la distribución de dichas variantes de CNP conjugadas en el cartílago. En una modalidad, las porciones de PEG contienen uno o más grupos amino primarios, secundarios o terciarios, grupos amonio cuaternario u otros grupos que contienen amina (por ejemplo, urea).

En otras modalidades, para cualquiera de las variantes de CNP descritas en la presente que contengan residuos de lisina (Lys/K), ya sea con una secuencia de tipo silvestre o una secuencia de aminoácidos no naturales, cualquier residuo de Lys puede sustituirse independientemente por cualquier otro aminoácido, natural o artificial, incluyendo sustituciones como Lys por Arg. En diversas modalidades, todos los residuos de lisina se sustituyen independientemente por cualquier otro aminoácido, natural o artificial, incluyendo sustituciones como Lys por Arg, excepto que el residuo de Lys en el dominio cíclico de la variante de CNP no se sustituye por ningún otro aminoácido, natural o artificial.

Variantes del péptido natriurético de tipo C

En la presente se contempla un método para elaborar una biblioteca de un gen variante asociado con baja estatura utilizando un constructo de expresión de vector lentiviral. Los ensayos de reporteros masivamente paralelos (MPRA) se han descrito previamente (Gordon et al., Nat Protoc. 2020 15(8): 2387–2412). Estos ensayos utilizaron una biblioteca de genes reguladores (por ejemplo, promotores y potenciadores) para determinar los efectos de las mutaciones genéticas en la capacidad de las regiones reguladoras para realizar la función reguladora. En otro ensayo, se generó una biblioteca de marcos de lectura abiertos de células T para identificar

genes que regulan positivamente la actividad de las células T (Daniloski, Nature 2022 603(7902):1-8).

Sin embargo, estos ensayos de reporteros paralelos no se han utilizado para identificar variantes de genes no reguladores cuando se combinan con un sistema reportero funcional. La presente descripción proporciona un método para elaborar una biblioteca lentiviral de variantes de receptores de superficie celular que posteriormente se introducen en una célula que expresa un constructo de reportero cuya lectura se correlaciona con la función del receptor de superficie celular.

Los vectores lentivirales son conocidos en el campo de la ingeniería genética. Los vectores lentivirales disponibles comercialmente pueden adaptarse según sea necesario para expresar una variante génica asociada con baja estatura o la proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, el vector lentiviral puede derivar del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la inmunodeficiencia equina (VIE), un lentivirus pseudotipado, un vector lentiviral pseudotipo VSVg, el vector pLS-SceI (ADDGENE) y otros vectores personalizables disponibles comercialmente (por ejemplo, VectorBuilder Inc.).

También se contemplan otros vectores virales disponibles comercialmente.

En diversas modalidades, el método es útil para elaborar una biblioteca de un gen variante asociado con baja estatura. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es colágeno (COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), agrecano (ACAN), hedgehog indio (IHH), PTPN11, NPR2, NPPC, FGFR3, receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R), DTL, PAPP2 o combinaciones de los mismos. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es NPR2, NPPC o FGFR3. En diversas modalidades, el gen variante asociado con baja estatura es NPR2.

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende variantes de NPR2. Se han identificado variantes que alteran la proteína NPR2 en el estudio UK Biobank y se han descrito en Estrada et al. (Nat Commun. 2021, 12(1):2224) y en la Publicación de Patente Internacional WO 2021/055497, incorporada en la presente como referencia. La secuencia de NPR2 se presenta en la Figura 10 y las variantes de NPR2 identificadas para detección en la biblioteca incluyen las que se presentan en la Figura 11. Aproximadamente 160 variantes genéticas de NPR2 se caracterizaron fenotípicamente recientemente utilizando un ensayo de "punto de captura" de cuantificación de cGMP descrito previamente (Estrada et al., *supra*). La presente preparación y detección de la biblioteca es mejor que el ensayo de punto de captura previo.

En una modalidad, el vector lentiviral comprende una región promotora. En diversas modalidades, el promotor es un promotor de CMV, un promotor de EFGR, un promotor de MND, un promotor de CAG, un promotor de PGK y un promotor de EF1A.

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende un gen de selección. En diversas modalidades, el gen de selección incluye puromicina, kanamicina, blasticidina G418 o neomicina.

En una modalidad, se utilizó un constructo de lentivirus bidireccional que expresa NPR2

y puromicina-T2A-BFP. En una modalidad, el constructo que expresa NPR2 del lentivirus se construyó mediante subclonación en un vector lentiviral bidireccional que expresaba puro-T2A-BFP en la otra dirección (Robinson et al., PLoS One 2021 Abr 9;16(4):e0249117).

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende además códigos de barras únicos asociados con el gen variante. En diversas modalidades, la variante en el vector comprende entre 10 y 60 códigos de barras. En diversas modalidades, la variante en el vector comprende entre 20 y 50 códigos de barras, entre 20 y 40 códigos de barras, o entre 30 y 45 códigos de barras.

En diversas modalidades, los códigos de barras tienen entre 15 a 30 pares de bases. En diversas modalidades, los códigos de barras tienen entre 18 y 25 pares de bases. En diversas modalidades, los códigos de barras tienen 20 pares de bases. Una biblioteca de códigos de barras ejemplar comprende aproximadamente 20 secuencias aleatorias de pares de bases con una complejidad $>10^9$. Una biblioteca de códigos de barras se construye, por ejemplo, como se describe en Azenta (Burlington, MA), y se clona en un vector lentiviral que comprende un gen variante de interés. Celecta diseñó y ejecutó los cebadores y el proceso de secuenciación de nueva generación para la secuenciación de códigos de barras utilizando un protocolo similar al descrito por el fabricante (manuals.celesta.com/ngs-prep-kit-for-sgrna-shrna-dna-barcode).

Métodos de Detección

La existencia de una variante de LoF o GoF en un gen relacionado con la baja estatura se determina mediante un ensayo de actividad biológica. En diversas modalidades, el ensayo biológico consiste en un ensayo de reportero de cGMP.

En diversas modalidades, el ensayo de reportero utiliza un constructo de expresión que comprende un dominio de unión a GMPc unido a un constructo de reportero. En diversas modalidades, el reportero es proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, luciferasa, beta-galactosidasa, etc. En diversas modalidades, el dominio de unión a GMPc es de la fosfodiesterasa humana o murina.

En diversas modalidades, el constructo de expresión es un vector lentiviral.

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende una región promotora. En diversas modalidades, el promotor es un promotor de CMV, un promotor de EFGR, un promotor de MND, un promotor de CAG, un promotor de PGK o un promotor de EF1A.

En diversas modalidades, el vector lentiviral comprende un gen de selección. En diversas modalidades, el gen de selección incluye puromicina, kanamicina, blasticidina G418 o neomicina.

En diversas modalidades, el constructo de expresión se transfecta o transduce en una célula huésped. En diversas modalidades, la célula huésped es una célula de mamífero. Las líneas celulares de mamíferos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, las células HEK293, CHO, MDCK, BHK, NIH/3T3, COS, A549, MEF o HeLa.

En diversas modalidades, el constructo de expresión comprende un dominio de unión a cGMP y un reportero de GFP. En diversas modalidades, el constructo de expresión comprende

un promotor de CMV operativamente unido al reportero de cGMP-GFP y un promotor de PGK operativamente unido a un gen de resistencia a la blastocidina. En diversas modalidades, el constructo de expresión se transfecta en células HEK293.

En diversas modalidades, las células transfectadas con un constructo de expresión de cGMP, como se describe en la presente, se ponen en contacto con CNP para inducir la producción de cGMP. En diversas modalidades, las células se ponen en contacto con CNP de aproximadamente 1 a 60 nM. En diversas modalidades, las células se ponen en contacto con CNP de aproximadamente 1 a 5 mM, CNP de aproximadamente 5 a 50 mM, CNP de aproximadamente 10 a 40 mM o CNP de aproximadamente 15 a 50 mM.

En diversas modalidades, el nivel de reportero expresado por el constructo de expresión se mide por ELISA, citometría de flujo, ensayo de sustrato enzimático u otro ensayo apropiado para el reportero seleccionado.

En diversas modalidades, se puede predecir una variante de LoF o GoF con base en el mapeo del cambio en la secuencia de la variante a la estructura 3D prevista y al dominio de actividad de una proteína codificada por el gen, por ejemplo, utilizando el mapeo 3D AlphaForm u otras herramientas de mapeo de proteínas.

Genes Asociados con la Baja Estatura

La acondroplasia es el resultado de una mutación autosómica dominante en el gen del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-3), que causa una anomalía en la formación de cartílago. El FGFR-3 normalmente tiene un efecto regulador negativo en el crecimiento de los condrocitos y, por lo tanto, en el crecimiento óseo. En la acondroplasia, la forma mutada del FGFR-3 es constitutivamente activa, lo que conduce a huesos gravemente acortados. En los seres humanos, las mutaciones activadoras del FGFR-3 son la causa principal del enanismo genético. Los ratones que tienen el FGFR-3 activado sirven como modelo de acondroplasia, la forma más común de las displasias esqueléticas, y la sobreexpresión del CNP rescata a estos animales del enanismo. En consecuencia, las variantes funcionales del CNP son posibles terapias para el tratamiento de las diversas displasias esqueléticas.

Al estimular la producción de matriz, la proliferación y la diferenciación de condrocitos y aumentar el crecimiento de huesos largos, las variantes de CNP de la descripción son útiles para tratar mamíferos, incluidos los humanos, que padecen un trastorno relacionado con los huesos, como una displasia esquelética o baja estatura. Los ejemplos no limitantes de trastornos relacionados con los huesos sensibles al CNP, displasias esqueléticas y trastornos de baja estatura incluyen acondroplasia, hipocondroplasia, baja estatura, baja estatura idiopática, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatofórica, osteogénesis congénita, acondrogénesis, acondroplasia homocigótica, condrodisplasia congénita, displasia campomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis congénita, síndromes de polidactilia de costillas cortas, tipo rizomélico de condrodisplasia congénita,

displasia metafisaria de tipo Jansen, displasia espondiloepifisaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, fémur corto congénito, displasia mesomélica de tipo Langer, displasia mesomélica de tipo Nievergelt, síndrome de Robinow, síndrome de Reinhardt, acrodisostosis, síndrome de disostosis, displasia de Kniest, fibrocondrogénesis, síndrome de Roberts, displasia acromesomélica, micromelia, síndrome de Morquio, síndrome de Kniest, displasia metatrófica y displasia espondiloepimetafisaria, trastornos relacionados con la mutación NPR2, mutación SHOX (síndrome de Turner/Leri Weill), mutaciones PTPN11 (síndrome de Noonan) y mutación IGF1R.

Los trastornos de baja estatura y de la placa de crecimiento adicionales contemplados por los métodos incluyen trastornos relacionados con mutaciones en el colágeno (COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), agrecano (ACAN), hedgehog indio (IHH), PTPN11, NPR2, NPPC, FGFR3 o IGF1R. En diversas modalidades, el gen de baja estatura es NPR2, NPPC o FGFR3.

Los trastornos de la placa de crecimiento incluyen trastornos que resultan en baja estatura o crecimiento óseo anormal y que pueden ser el resultado de una mutación genética en un gen involucrado en el crecimiento óseo, incluyendo colágeno (COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), agrecano (ACAN), hedgehog indio (IHH), PTPN11, NPR2, NPPC, FGFR3 o IGF1R. En diversas modalidades, el trastorno de la placa de crecimiento o baja estatura está asociado con una o más mutaciones en un gen asociado con una RASopatía. En diversas modalidades, un sujeto con un trastorno de la placa de crecimiento es heterocigoto para una mutación en un gen de la placa de crecimiento. En diversas modalidades, la mutación es una mutación de pérdida de función. En diversas modalidades, la mutación es una mutación de ganancia de función. Los trastornos de la placa de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, baja estatura familiar, baja estatura familiar dominante que también se conoce como baja estatura hereditaria dominante o baja estatura idiopática. Ver, por ejemplo, Plachy et al., J Clin Endocrinol Metab 104: 4273-4281, 2019.

Las mutaciones en ACAN pueden dar lugar a osteocondritis disecante familiar y baja estatura, y eventualmente a osteoartritis, caracterizada por áreas de daño óseo (o lesiones) causadas por el desprendimiento de cartílago y, a veces, hueso del extremo del hueso en una articulación. Se ha sugerido que la red de cartílago desorganizada en los huesos en crecimiento perjudica su crecimiento, lo que conduce a baja estatura. Una mutación asociada con ACAN y baja estatura es Val2303Met. Ver Stattin et al., Am J Hum Genet 86(2):126-37, 2010. Se contempla que los pacientes con una mutación en ACAN que resulte en baja estatura se beneficiarían del tratamiento con CNP, ya que su administración podría aumentar la estatura en estos pacientes mediante la interacción conocida de CNP con FGFR3.

Se ha demostrado que el sistema de péptidos natriuréticos, incluido el receptor NPR2, está involucrado en la regulación del crecimiento óseo endocondral (Vasques et al., Horm Res Pediat 82:222-229, 2014). Los estudios han demostrado que las mutaciones de pérdida de función homocigóticas o heterocigóticas compuestas en NPR2 causan displasia acromesomélica

tipo Maroteaux (AMDM), que es una displasia esquelética que tiene una estatura extremadamente baja (Vasquez et al., 2014, *supra*). Hay informes que implican mutaciones heterocigóticas de pérdida de función (como dominante negativa) de NPR2 como causa de estatura baja, mientras que se ha descubierto que las mutaciones heterocigóticas de ganancia de función de NPR2 son responsables de la estatura alta (Vasquez et al., 2014, *supra*). En vista de la interacción del CNP con NPR2 para estimular la generación de cGMP, aumentar los niveles de cGMP es deseable en estas condiciones y tendría un beneficio terapéutico en el manejo de las complicaciones de estas enfermedades y condiciones.

Se cree que las mutaciones heterocigotas del gen NPR2 causan baja estatura idiopática y otras formas de baja estatura. Las mutaciones del gen NPR2 se exponen a continuación y se describen en Amano et al., J Clin Endocrinol Metab 99:E713-718, 2014, Hisado-Oliva et al., J Clin Endocrinol Metab 100:E1133-1142, 2015 y Vasques et al., J Clin Endocrinol Metab. 98:E1636-1644, 2013, incorporada como referencia. Se contempla que un sujeto con baja estatura, que se va a tratar con una variante de CNP, como se describe en la presente, tenga una SDS de estatura menor de -1,0, -1,5, -2,0, -2,5 o -3,0, y tenga al menos un progenitor con una SDS de estatura menor de -1,0, -1,5, -2,0 o -2,5, opcionalmente en donde el segundo progenitor tenga una estatura dentro del rango normal. En diversas modalidades, las variantes de CNP son útiles para tratar a un sujeto con baja estatura que tiene una SDS de estatura de entre -2,0 a -3,0. En diversas modalidades, las variantes de CNP son útiles para tratar a un sujeto con baja estatura que tiene una SDS de estatura de entre -2,0 a -2,5. Sin embargo, dado que las mutaciones de novo en NPR2 pueden provocar baja estatura, definida por una SDS de estatura menor de -1,5, -2,0, -2,5 o -3,0, también se contempla el tratamiento de personas heterocigotas portadoras de una mutación deletérea en NPR2 sin que ninguno de sus progenitores presente baja estatura. También se contempla el tratamiento de personas heterocigotas para mutaciones deletéreas en otros genes de la placa de crecimiento con CNP para mejorar la estatura y/o aumentar el crecimiento óseo.

Se describen mutaciones ejemplares en NPR2 en la Publicación de Patente Internacional WO 2021/055497, incorporada en la presente como referencia.

El papel de NPPC en el crecimiento esquelético está bien documentado (Hisado-Oliva et al., Genetics Medicine 20:91-97, 2018). El ratón con inactivación genética de NPPC mostró una forma desproporcionada severa de enanismo que incluía acortamiento de extremidades y osificación endocondral (Hisado-Oliva et al., 2018, *supra*). Estudios de todo el genoma humano han demostrado una relación entre NPPC y estatura (Hisado-Oliva et al., 2018, *supra*). Aunque se ha creído que la haploinsuficiencia de CNP es una causa de baja estatura en humanos, un estudio reciente identificó mutaciones heterocigotas en familias con baja estatura y manos (Hisado-Oliva et al., 2018, *supra*). Estos estudios observaron una reducción significativa en la producción de cGMP medida en estado heterocigoto (Hisado-Oliva et al., 2018, *supra*). Las mutaciones en NPPC incluyen una mutación de sentido erróneo 355G>T que causa un cambio

en Gly119Cys y una mutación de sentido erróneo 349C>G que causa un cambio en Arg117Gly. Una variante de CNP que rescata la producción de cGMP podría ofrecer un beneficio terapéutico en el manejo de un trastorno en pacientes con mutaciones heterocigotas de pérdida de función en NPPC.

5 La discondrosteosis de Leri-Weill (LWD) es un trastorno genético poco común que se caracteriza por el acortamiento de los antebrazos y la parte inferior de las piernas, la desalineación anormal de la muñeca (deformidad de Madelung de la muñeca) y la estatura baja asociada. La LWD está causada por una mutación heterocigótica en el gen que contiene el homeobox de baja estatura (SHOX) o sus elementos reguladores ubicados en la región

10 pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas sexuales. (Ver la Base de Datos de Enfermedades Raras y Carmona et al., Hum Mol Genet 20:1547-1559, 2011). La displasia mesomélica de Langer surge cuando hay dos mutaciones SHOX y puede resultar de una mutación en cada cromosoma, ya sea una mutación homocigótica o heterocigótica compuesta. Un subconjunto de mutaciones SHOX da lugar a la estatura baja idiopática. El síndrome de

15 Turner resulta debido a una delección en el cromosoma X que puede incluir el gen SHOX. Se ha identificado que SHOX participa en la regulación de la transcripción de *FGFR3* y contribuye al control del crecimiento óseo (Marchini et al., Endocr Rev. 37: 417–448, 2016). La deficiencia de SHOX conlleva un aumento de la señalización de FGFR3, y existe evidencia que respalda que SHOX también interactúa directamente con CNP/NPR2 (Marchini, *supra*). Dada la asociación de

20 SHOX con FGFR3 y el crecimiento óseo, se considera que un sujeto con una mutación homocigótica o heterocigótica de SHOX se beneficiaría del tratamiento con variantes de CNP, como se describe en la presente.

Las RASopatías son un grupo de enfermedades genéticas raras causadas por mutaciones en genes de la vía Ras/proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Se

25 caracterizan por un aumento de la señalización a través de la vía RAS/MAPK. Esta vía conduce a la activación de la vía RAF/MEK/ERK. La baja estatura es un rasgo característico de ciertas RASopatías. Por ejemplo, la señalización del CNP inhibe la RAF y disminuye la activación de MEK y ERK.

Las RASopatías asociadas con baja estatura incluyen el síndrome de Noonan, el

30 síndrome de Costello, el síndrome cardiofaciocutáneo, la neurofibromatosis tipo 1 y el síndrome LEOPARD. La fibromatosis gingival hereditaria tipo 1 también es una RASopatía contemplada en la presente. Los pacientes con RASopatía (incluidos el síndrome de Noonan, el síndrome de Costello, el síndrome cardiofaciocutáneo, la neurofibromatosis tipo 1, el síndrome LEOPARD y la fibromatosis gingival hereditaria tipo 1) incluyen pacientes con variantes heterocigotas en uno

35 o más de los siguientes genes: BRAF, CBL, HRAS, KRAS, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MRAS, NF1, NRAS, PPP1CB, PTPN11, RAF1, RRAS, RIT1, SHOC2, SOS1 o SOS2 (Tajan et al. Endocr. Rev. 2018;39(5):676–700).

El CFC es causado por mutaciones en diversos genes en la vía de señalización

Ras/MAPK, incluyendo K-Ras, B-Raf, Mek1 y Mek2. El síndrome de Costello, también llamado síndrome faciocutáneo-esquelético (FCS) es causado por mutaciones activadoras en el gen H-Ras. La fibromatosis gingival hereditaria tipo I (HGF) es causada por mutaciones dominantes en el gen SOS1 (homólogo 1 de *Son of Sevenless*), que codifica un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS) que actúa sobre la subfamilia Ras de pequeñas GTPasas. La neurofibromatosis tipo I (NF1) es causada por mutaciones en el gen de la neurofibromina 1, que codifica un regulador negativo de la vía de señalización Ras/MAPK. El síndrome de Noonan (NS) es causado por mutaciones en uno de diversos genes, incluyendo PTPN11, que codifica SHP2, y SOS1, así como K-Ras y Raf-1.

Se ha demostrado que el CNP es una terapia efectiva en modelos de RASopatía. Ono et al. generaron ratones deficientes en *Nf1* en células productoras de colágeno tipo II (Ono et al., Hum. Mol. Genet. 2013;22(15):3048–62). Estos ratones demostraron una activación constitutiva de ERK1/2 y una disminución de la proliferación y maduración de los condrocitos. Las inyecciones diarias de CNP en estos ratones llevaron a una disminución de la fosforilación de ERK y corrigieron la baja estatura. Un modelo de ratón de síndrome cardiocutáneo que utiliza una mutación *Braf* (p.Q241R) (Inoue et al. Hum. Mol. Genet. 2019;28(1):74–83) exhibió una disminución de la longitud corporal y una reducción del ancho de la placa de crecimiento con zonas proliferativas e hipertróficas más pequeñas en comparación con el tipo silvestre, y la administración de CNP llevó a aumentos en la longitud corporal en estos animales.

Las mutaciones en múltiples genes pueden causar el síndrome de Noonan, que se caracteriza por baja estatura, cardiopatías, problemas hemorrágicos y malformaciones esqueléticas. Las mutaciones en el gen PTPN11 causan aproximadamente la mitad de los casos de síndrome de Noonan. Las mutaciones en el gen SOS1 causan entre 10% a 15% adicional, y los genes RAF1 y RIT1 representan aproximadamente 5% de los casos cada uno. Las mutaciones en otros genes representan un pequeño número de casos cada una. Se desconoce la causa del síndrome de Noonan en entre 15% a 20% de las personas con este trastorno.

Los genes PTPN11, SOS1, RAF1 y RIT1 codifican proteínas importantes en la vía de señalización celular RAS/MAPK, necesaria para la división y el crecimiento celular (proliferación), la diferenciación y la migración celular. Muchas de las mutaciones en los genes asociados con el síndrome de Noonan provocan la activación de la proteína resultante. Esta activación prolongada altera la señalización normal de RAS/MAPK, lo que altera la regulación del crecimiento y la división celular y da lugar a los rasgos característicos del síndrome de Noonan. Ver, por ejemplo, Chen et al., Proc Natl Acad Sci US A. 111(31):11473-8, 2014, Romano et al., Pediatrics. 126(4):746-59, 2010, y Milosavljević et al., Am J Med Genet 170(7):1874-80, 2016. Se considera que un sujeto con mutaciones que activan la vía MAPK se beneficiaría del tratamiento con variantes de CNP, como se describe en la presente, para mejorar el crecimiento óseo y la baja estatura. También se considera que un sujeto con mutaciones que activan la vía MAPK se beneficiaría del tratamiento con variantes de CNP para mejorar otras comorbilidades

asociadas con una vía MAPK hiperactiva en otras células del cuerpo donde se expresa el receptor NPR2 en su superficie.

Las mutaciones en el gen PTPN11, que codifica la proteína no receptora tirosina fosfatasa SHP-2, conducen a trastornos caracterizados por baja estatura como el síndrome de Noonan (Musente et al., Eur J Hum Genet 11:201–206 (2003). Musente (*supra*) identifica numerosas mutaciones en el gen PTPN11 que conducen a baja estatura. Las mutaciones de ganancia de función conducen a una señalización hiperactiva a través de SHP2 e inhiben la liberación de IGF-1 inducida por la hormona del crecimiento, lo que contribuye a una disminución del crecimiento óseo (Rocca Serra-Nédélec, PNAS 109:4257-4262, 2012). Se contempla que un sujeto que tenga una mutación homocigótica o heterocigótica de PTPN11 se beneficiaría del tratamiento con variantes de CNP para mejorar el crecimiento óseo y la baja estatura.

Las mutaciones en el gen del hedgehog indio (IHH), relacionado con la regulación de la osificación endocondral, también se han asociado con síndromes de baja estatura (Vasques et al., J Clin Endocrinol Metab. 103:604-614, 2018). Muchas mutaciones de IHH identificadas se asocian con baja estatura según un patrón de herencia dominante. Dada la asociación de IHH con el crecimiento y la osificación ósea, se considera que los sujetos con una mutación homocigótica o heterocigótica de IHH se beneficiarán del tratamiento con una variante de CNP, como se describe en la presente.

Las mutaciones en FGFR3, incluidas N540K y K650N, provocan baja estatura e hipocondroplasia.

El receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R) es una glucoproteína transmembrana heterotetramérica ($\alpha 2\beta 2$) con actividad quinasa intrínseca. Se ha demostrado que el IGF1R desempeña un papel en el crecimiento prenatal y posnatal. Se han identificado mutaciones heterocigotas en el IGF1R en niños pequeños para la edad gestacional (PEG) e individuos con baja estatura familiar (Kawashima et al., Endocrine J. 59:179-185, 2012). Las mutaciones en el IGF1R asociadas con baja estatura incluyen R108Q/K115N, R59T, R709Q, G1050K, R481Q, V599E y G1125A (Kawashima, *supra*).

La estatura es un rasgo altamente hereditario que puede verse influenciado por el efecto combinado de cientos o miles de genes (Wood et al., 2014, Nature Genetics, 46:1173-1189). La baja estatura en un individuo puede ser resultado del efecto combinado de los mismos genes, sin que un solo gen sea el principal contribuyente. Se contempla que los individuos con baja estatura, definida por una SDS de estatura menor de -1,0, -1,5, -2,0, -2,5 o -3,0, pueden ser tratados beneficiosamente con una variante del CNP, dada su capacidad para aumentar la longitud en animales normales, por ejemplo, mejorando el crecimiento y la longitud de los huesos.

En diversas modalidades, las variantes de CNP son útiles para tratar a un sujeto con baja estatura con una SDS de estatura menor de -1,0, -1,5, -2,0, -2,5 o -3,0, y que tiene al menos un progenitor con una SDS de estatura menor de -1,0, -1,5, -2,0 o -2,5, opcionalmente donde el segundo progenitor tiene una estatura dentro del rango normal. En diversas modalidades, las

variantes de CNP son útiles para tratar a un sujeto con baja estatura que tiene una SDA de estatura de entre -2,0 a -3,0. En diversas modalidades, las variantes de CNP son útiles para tratar a un sujeto con baja estatura que tiene una SDS de estatura de entre -2,0 a -2,5. En diversas modalidades, la baja estatura está asociada con una o más mutaciones en un gen asociado con baja estatura, como el colágeno (COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), el

5 agrecano (ACAN), el gen hedgehog indio (IHH), PTPN11, NPR2, NPPC, FGFR3, receptor del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1R), DTL, PAPPA2 o combinaciones de los mismos.

En diversas modalidades, el trastorno de la placa de crecimiento o la estatura baja están asociados con una o más mutaciones en un gen asociado con una RASopatía.

10 En diversas modalidades, la baja estatura es el resultado de mutaciones en múltiples genes según lo determinado por la puntuación de riesgo poligénico (PRS). Las puntuaciones de riesgo poligénico (PRS) se calculan para la estatura utilizando el metaanálisis del estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) más grande publicado para la estatura que no incluye ninguna muestra del proyecto UK Biobank como se describe en WO 2021/055497. La cohorte

15 puede dividirse en cinco quintiles de PRS (PRS 1 es la estatura más baja, PRS 5 la estatura más alta). En diversas modalidades, el sujeto tiene una mutación en NPR2 y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto tiene una mutación en FGFR3 y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto tiene una mutación en NPR2 y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto tiene una mutación en IGF1R y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto tiene

20 una mutación en NPPC y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto tiene una mutación en SHOX y una PRS baja. En diversas modalidades, el sujeto presenta una o más mutaciones en uno o más de los siguientes genes: FGFR3, IGF1R, NPPC, NPR2 y SHOX, y una PRS baja. En diversas modalidades, la PRS es 1 o 2. En diversas modalidades, la PRS es 1. En diversas modalidades, la PRS es 2.

25 Además, las variantes del CNP son útiles para tratar otras afecciones y trastornos relacionados con los huesos, como el raquitismo, el raquitismo hipofosfatémico [incluido el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (también llamado raquitismo resistente a la vitamina D) y el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante] y la osteomalacia [incluida la osteomalacia inducida por tumores (también llamada osteomalacia oncogénica u osteomalacia

30 hipofosfatémica oncogénica)].

Los genes ejemplares relacionados con la displasia esquelética o baja estatura incluyen, pero no se limitan a, NPR2, SHOX, PTPN11, COL2A1, COL11A1, COL9A2, COL10), agrecano (ACAN), hedgehog indio (IHH), NPPC, FGFR3, IGF1R, DTL y proteína plasmática A2 asociada al embarazo (PAPPA2).

35 Se informa que el CNP también mejora la resistencia ósea en sujetos con acondroplasia que reciben terapia a largo plazo con CNP. Se describe un método para mejorar o mantener la resistencia ósea en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración de un péptido natriurético de tipo C (CNP). En diversas modalidades, el sujeto tiene un trastorno óseo, como

displasia esquelética o baja estatura. Los ejemplos no limitantes de trastornos relacionados con los huesos sensibles al CNP, displasias esqueléticas y trastornos de baja estatura incluyen acondroplasia, hipocondroplasia, baja estatura, baja estatura idiopática, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatofórica, osteogénesis imperfecta, osteogénesis congénita, 5 acondrogénesis, acondroplasia homocigótica, condrodisplasia congénita, displasia campomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis congénita, síndromes de polidactilia de costillas cortas, tipo rizomérico de condrodisplasia congénita, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia espondiloepifisaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, fémur corto congénito, displasia mesomélica tipo Langer, displasia 10 mesomélica tipo Nievergelt, síndrome de Robinow, síndrome de Reinhardt, acrodisostosis, disostosis periférica, displasia de Kniest, fibrocondrogénesis, síndrome de Roberts, displasia acromesomélica, micromelia, síndrome de Morquio, síndrome de Kniest, displasia metatrófica, displasia espondiloepimetafisaria, trastornos relacionados con la mutación NPR2, mutación SHOX (síndrome de Turner/Leri Weill), mutaciones PTPN11 (síndrome de Noonan), mutación 15 IGF1R, raquitismo, raquitismo hipofosfatémico [incluido el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (también llamado raquitismo resistente a la vitamina D) y el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante] y osteomalacia [incluida la osteomalacia inducida por tumores (también llamada osteomalacia oncogénica u osteomalacia hipofosfatémica oncogénica)].

20 En ciertas modalidades, las variantes de CNP, así como las composiciones y formulaciones que las comprenden, de la presente descripción, son útiles para mejorar uno o más de los síntomas o consecuencias fisiológicas de una displasia esquelética. La mejora puede consistir en un aumento del crecimiento absoluto, una mayor velocidad de crecimiento, una mayor densidad mineral ósea (QCT) observada en la tomografía computarizada cualitativa 25 (QCT), una mejora en la morfología de la placa de crecimiento, un mayor crecimiento de los huesos largos, una mejora en la morfología espinal, una mejor amplitud de movimiento de la articulación del codo y/o una disminución de la apnea del sueño. En este sentido, cabe destacar que los términos “mejorado”, “mejora”, “aumento”, “disminución” y equivalentes gramaticales de los mismo son términos relativos que, cuando se utilizan en relación con un síntoma o una 30 consecuencia fisiológica de una enfermedad, se refieren al estado del síntoma o la consecuencia fisiológica de la enfermedad tras el tratamiento con una variante de CNP (o una composición o formulación que comprende la misma) de la presente invención, en comparación con el mismo síntoma o consecuencia fisiológica de la enfermedad antes del tratamiento con una variante de CNP (o una composición o formulación que comprende la misma) de la presente invención (es 35 decir, en comparación con el “valor inicial”). Como se describió anteriormente, un estado “inicial” se puede determinar ya sea a través de la medición del estado del sujeto antes del tratamiento (que posteriormente se puede comparar con el estado del mismo sujeto después del tratamiento), o a través de la medición de ese estado en una población de sujetos que padecen la misma

aflicción y que comparten las mismas características o características similares (por ejemplo, edad, sexo y/o estado o progresión de la enfermedad).

En todavía otra modalidad, la descripción proporciona variantes de CNP que *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% o 150% del nivel de cGMP producido bajo la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μ M). En una modalidad aún adicional, las variantes de CNP de la descripción *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% o 150% del nivel de cGMP producido bajo la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μ M).

Se contempla que cualquiera de las variantes de CNP descritas en la presente son útiles en los métodos.

Aspectos y detalles adicionales de la descripción serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, que pretenden ser ilustrativos más que limitantes.

Los expertos en la materia apreciarán otros aspectos y ventajas a partir de la siguiente descripción detallada, junto con las figuras. Si bien las composiciones, artículos y métodos pueden implementarse de diversas formas, la descripción que sigue incluye implementaciones específicas, entendiéndose que la descripción es ilustrativa y no pretende limitar la invención a las implementaciones específicas descritas en la presente. Para las composiciones, artículos y métodos descritos en la presente, se contempla la selección de características opcionales, incluyendo, pero no limitado a, componentes, rangos de composición, sustituyentes, condiciones y pasos, entre los diversos aspectos, implementaciones y ejemplos proporcionados en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Construcción de un constructo de lentivirus que expresa NPR2

Materiales y métodos

Construcción de vector y línea celular. Se diseñó un reportero de cGMP-GFP-on subclonando el inserto cGull de (Matsuda et al, ACS Sens 2017 2(1):46-51) y clonándolo en el vector lentiviral personalizado VectorBuilder (VectorBuilder Inc., Chicago, IL) con el promotor de CMV que impulsa cGull y la PGK de ratón que impulsa la resistencia a la blastocidina. cGull comprende el dominio de unión a cGMP de la fosfodiesterasa 5 α de ratón. La línea reportera HEK293 cGMP-GFP-on se construyó transduciendo células HEK293T p11 con virus reportero de cGMP-GFP MOI=0,2 y selección con blasticidina (10 μ g /ml) durante 4 días. Las células se analizaron transfectando el vector que expresaba NPR WT y estimulando las células con CNP 50 nM.

Se utilizó un constructo de lentivirus bidireccional personalizado que expresa NPR2 y puro-T2A-BFP. El constructo de lentivirus que expresa NPR2 se construyó mediante subclonación (PspXI /NotI) en un vector bidireccional personalizado que expresa puro-T2A-BFP

en la dirección opuesta (Robinson et al., PLoS One 9 de abril de 2021;16(4):e0249117).

Síntesis de códigos de barras y cebadores NGS para secuenciación de códigos de barras.

Se construyó y clonó (Genewiz/Azenta) una secuencia aleatoria de 20 pb con una complejidad $>10^9$ en el sitio PmeI del vector NPR2. Cellalecta diseñó y ejecutó los cebadores y el proceso de secuenciación NGS para la secuenciación de códigos de barras utilizando un protocolo similar al descrito por el fabricante (manuals.cellalecta.com/ngs-prep-kit-for-sgrna-shrna-dna-barcode-libraries).

Tabla 1

Fwd-NPR2-98539	TGTCTGGATCTCAAATCCCTCGGA (SEQ ID NO: 54)
Rev-NPR2-98539	AGGAAAGATGCGAACATACTGGCT (SEQ ID NO: 55)
P5-NFwd-NPR2-98539	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCATCGAA TTCCTGCAGCC (SEQ ID NO: 56)
P7-NRev-NPR2-98539-IND-A	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCACGACGAGACG CAGACGAATACG ACAGAGCTGGCTCTTAGGAGAGCGGA (SEQ ID NO: 57)
FSeq-NPR2-98539-BC	AGCTCAGTTAGCCTCCCCATCTCTCGGTTTAAAC (SEQ ID NO: 58)

Clonación de variantes de NPR2 y asociación de códigos de barras con variantes mediante PacBio. Se seleccionaron 160 variantes de NPR2 (Tabla 2) del UKBB, se amplificaron como un pool y se clonaron vía PspXI /NotI en el vector NPR2 con código de barras. Se seleccionaron 25 códigos de barras únicos por variante, lo que produjo una biblioteca final de aproximadamente 4K elementos. La secuenciación mediante PacBio se realizó mediante un método sin amplificación (digestión con HpaI/BstEII) (preinformación de la biblioteca) y se secuenció en el Smart-seq Sequel I, lo que resultó en lecturas alineadas con X. El análisis para asociar la variante con el código de barras implicó una alineación de lecturas largas. La secuencia de referencia utilizada para la alineación estaba compuesta por una única entrada fasta que contenía la secuencia del gen NPR2 seguida de una secuencia espaciadora de 54 pb (AGCGGCCGCGTTGGTCAGGCTTGGATTTCTATAACTTCGTATAGCAGTTTAAAC) (SEQ ID NO: 59), una secuencia de código de barras de 20 pb y finalmente una secuencia flanqueante de código de barras 3' de 20 pb (GTTTAAACCGAGAGATGGGG) (SEQ ID NO: 60). Para tener en cuenta la estructura semidegenerada del código de barras, se utilizaron Ns para rellenar esta parte de la referencia. La alineación se realizó con una implementación específica de PacBio de *minimap2*, concretamente *pbmm2 align*, donde se mantuvieron todos los parámetros predeterminados. Todas las lecturas que no se asignaron a la secuencia de referencia se excluyeron de un análisis posterior. El ensamblaje de la estructura de lectura y la extracción del código de barras se realizó utilizando la api *python* de *samtools*, concretamente se utilizó *pysam*,

para iterar sobre lecturas alineadas y extraer las posiciones de referencia alineadas con las bases alineadas de la lectura (excluyendo las bases recortadas suaves*) y la cadena cigar*. Las lecturas que no cubrían el inicio del gen NPR2 ni la secuencia del código de barras se excluyeron de un análisis posterior. La secuencia del código de barras se extrajo mediante una expresión regular simple utilizando la biblioteca *regex de python*. Se utilizó una secuencia flanqueante de código de barras de 5', compuesta por los últimos 20 pb de la secuencia espaciadora mencionada anteriormente, para identificar la posición del código de barras, donde *regex* permitió un error de 1 pb (inserción, eliminación o sustitución) al buscar esta secuencia. Se asumió entonces que los siguientes 20 pb después de la secuencia flanqueante eran el código de barras. Después de la extracción del código de barras, la lectura alineada se recreó con el uso de la cadena cigar para tener en cuenta las inserciones y eliminaciones. Cuando se identificaron deleciones en la lectura, se insertó un guion (-) y se eliminaron las bases insertadas. Después de reconstruir la lectura, las posiciones variantes conocidas se pudieron extraer simplemente mediante indexación. Se utilizó el pulido de códigos de barras para corregir posibles errores de secuenciación en el código de barras. Aquí, los códigos de barras con secuencias idénticas se agruparon en clústeres. Si una secuencia de código de barras específica se observó más de 5 veces, se asumió que era un código de barras genuino. Si se observó 5 veces o menos, podría haber resultado de un error de secuenciación. Los códigos de barras con posibles errores de secuenciación se compararon con todos los códigos de barras en la lista 'genuina' por distancia de Levenstein*, con el uso de la biblioteca de *python pylev*. Si un código de barras tenía una distancia de Levenstein de 2 o menos a un código de barras 'genuino', se colocó en este clúster.

Empaquetado, infección y detección de la biblioteca. Se sembraron células HEK293T a 65.000 células por ccm en un matraz T225 en 40 ml de medio (DMEM, 10% suero bovino fetal) y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% CO₂. A la mañana siguiente, se mezclaron 10,5 µg de plásmido de biblioteca de ARNsg y 12 µg de mezcla de empaquetado lentiviral LV-MAX (ThermoFisher) y 22,5 µl de Lipofectamina 2000 (ThermoFisher) en 2 ml de OptiMEM sin suero (Gibco), se agitaron en vórtex y se incubaron durante 10 min a RT y se añadieron a las células. 24 h después, se añadieron 40 U de DNaseI (NEB) a cada placa para eliminar el plásmido no transfectado y a las 72 h post-transfección, se cosechó el sobrenadante, se pasó a través de filtros de 0,45 µm (Millipore, Stericup) y se almacenaron alícuotas a -80°C. Las células reporteras HEK293-cGMP-GFP se infectaron con la biblioteca a MOI=0,2 para producir una cobertura inicial de ~500X. Las células infectadas de la biblioteca se seleccionaron puro (~2µg/ml) durante 4 días y la cobertura se mantuvo siempre por encima de 1000X durante la duración de la detección. La detección implicó resuspender las células (~150M células por réplica) y estimular con CNP 0, 1 o 50nM durante 1h con agitación suave. Se realizaron clasificaciones por réplica en el Aria2, obteniendo una cobertura de aproximadamente 250X (4 millones de células) por réplica, tanto para GFP alta (15% superior) como para GFP baja (15% inferior). Los sedimentos celulares se congelaron y posteriormente se procesaron para la secuenciación de código de barras utilizando

las secuencias de cebadores descritas anteriormente. Se realizó un análisis de Mageck y Mann-Whitney comparando 4 réplicas con GFP alta y 4 muestras clasificadas con GFP baja.

Ejemplo 2 - Estrategia de detección

5 Se contempla que pueden ser necesarias múltiples rondas de detección para alcanzar el método de alto rendimiento. La biblioteca #1 se utiliza para establecer una estrategia de detección mediante un sistema de reportero de GFP-on sensible a cGMP para caracterizar fenotípicamente las variantes genéticas de NPR2. La biblioteca #2 (aproximadamente 60 veces mayor) es útil como estrategia de detección similar para caracterizar fenotípicamente variantes a mayor escala (por ejemplo, ~160 NPR2) en paralelo. La biblioteca #3 puede caracterizar fenotípicamente ~450 variantes de NPR2 en paralelo. La generación de la biblioteca requiere la alineación inicial de las secuencias mediante lecturas largas, el ensamblaje de las estructuras de lectura y la extracción de los códigos de barras, utilizando las secuencias de flanco 5' y 3'. Se identifican los códigos de barras de cada variante y se determina si son códigos de barras únicos que identifican una variante.

Se desea un número elevado de códigos de barras por variante (por ejemplo, aproximadamente 30) en el método, ya que esto permite un mayor número de réplicas, aumenta la potencia estadística del método, controla la integración, proporciona heterogeneidad celular y permite una mayor cobertura del gen. En la preparación de la Biblioteca 1, se observaron aproximadamente 20 códigos de barras por variante, lo que arroja una asociación única de códigos de barras del 93,3%.

Ejemplo 3. Establecimiento de Lenti-NPR2 y el reportero de cGMP-GFP-on

Para determinar si el vector lentiviral que comprende el gen NPR2 es detectable cuando se transduce en células, se desarrolló un sistema reportero lentiviral.

Las células y el vector se generaron como se describe en el Ejemplo 1. La estimulación de células HEK con el vector lenti-NPR2 con cGMP produjo niveles detectables de GFP en la célula. Estos niveles son comparables a los del ensayo de Punto de captura, utilizado previamente para caracterizar variantes de NPR2 (Figura 3).

30 A continuación, las bibliotecas de variantes se examinan para determinar el efecto de la variante en la función de NPR2 utilizando el ensayo del reportero de cGMP-GFP utilizando células HEK293 que expresan el constructo del reportero de GFP y se transfectaron con la biblioteca de variantes de NPR2. Las células positivas de la biblioteca se aislaron con base en la selectividad de puromicina y luego se clasificaron con base en la expresión de GFP alta a baja. Se extrajo ADN de las células y el ADN vinculado a los códigos de barras de la biblioteca se amplificó mediante secuenciación de próxima generación. Luego, las variantes secuenciadas se asociaron con su perfil de GFP alta o baja previamente identificado, y se evaluó el efecto de la variante de NPR2 en la función, por ejemplo, ganancia de función o pérdida de función. Por

ejemplo, en la detección, las LoF tendrán más recuentos en muestras de GFP baja (en relación con WT) (Figura 4B).

Utilizando controles de función conocida, se analizaron variantes en el presente ensayo, y se observó que las muestras clasificadas presentan una alta correlación con la función.

5 Además, se puede utilizar la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para analizar los datos, ya que es una prueba no paramétrica de la hipótesis nula que, para valores X e Y seleccionados aleatoriamente de dos poblaciones, la probabilidad de que X sea mayor que Y es igual a la probabilidad de que Y sea mayor que X . El análisis es robusto, proporciona direccionalidad fenotípica e identificó con éxito controles positivos y otras variantes significativas.

10 La detección de la Biblioteca 2, que comprende aproximadamente 160 variantes, demostró que el método proporciona una herramienta de detección altamente correlativa. Las variantes de NPR2 identificadas previamente en Estrada et al. (*supra*) se detectaron utilizando el presente método, y este arrojó resultados consistentes con el fenotipo de NPR2 previamente identificado, identificando variantes tanto de LoF como de GoF (Figura 6).

15 La actividad funcional de las variantes se categorizó por sus consecuencias genéticas y efectos fenotípicos (Figuras 7A-7B). Los niveles de cGMP se midieron por la consecuencia funcional de la variante. En el caso de las variantes de sentido erróneo, las predicciones de Varsity ER LOO permiten discriminar parcialmente entre las variantes de sentido erróneo que alteran la función de NPR2. En la Figura 7C se muestra una comparación de las mediciones de cGMP
20 obtenidas mediante el presente análisis de la biblioteca con su efecto sobre la estatura adulta humana, determinado por el UKBiobank.

El método también es útil para identificar mutaciones mal caracterizadas. Por ejemplo, anteriormente se creía que la variante Gln744del era una delección de 3 nucleótidos en el marco de lectura, que no modifica la función de NPR2. Sin embargo, en el presente análisis se identificó
25 una discrepancia, caracterizando la variante como una delección de 4 nucleótidos que resulta en una variante de LoF en lugar de una variante neutra.

Se planteó la hipótesis de que el método actual, con su mayor sensibilidad en comparación con los métodos anteriores, podría ser capaz de detectar variantes utilizando concentraciones más bajas de CNP. Se ha demostrado que algunas respuestas de mutaciones
30 de GoF (por ejemplo, R562Q) se saturan con dosis altas de CNP. Las GoF podrían ser más fáciles de identificar en condiciones donde las concentraciones de CNP son limitantes.

Se generó una curva de estimulación de CNP utilizando 8 concentraciones de CNP, desde 50 nM hasta 0 nM de Pro-Gly-CNP37, mediante un ensayo de punto de captura de cGMP. Las células cGULL GFP ON se transfectaron transitoriamente con Lipo 3000 en una placa de 6
35 pocillos con 2 μ g de plásmido. Se realizaron cuadruplicados para una mayor precisión. El análisis identificó 7 GoF adicionales con baja concentración de CNP (únicamente se identificaron 3 GoF del primer análisis, con alta concentración de CNP) y se obtuvieron GoF no superpuestas (Arg804) (Figura 8).

También se confirmó que la detección con un CNP bajo, por ejemplo, 1 nM, no comprometió el aislamiento de variantes de LoF.

Las puntuaciones poligénicas de la estatura modifican el efecto de las variantes de NPR2 en la puntuación de riesgo poligénica para la baja estatura. Esta puntuación puede utilizarse en combinación con el método de detección para predecir el riesgo de baja estatura idiopática en individuos. La Figura 9A muestra cómo varía la estatura adulta según la puntuación poligénica en personas que informaron baja estatura a los 10 años. Si bien únicamente el 29% de los mismos individuos presentó baja estatura en la edad adulta (puntuación Z de estatura < SDS - 2,25), el 98% presentó una estatura inferior a la media. Las puntuaciones poligénicas resumen los efectos combinados de miles de variantes comunes con pequeños efectos en la estatura. Estas puntuaciones capturan el 43% de la variación poblacional total en la estatura humana adulta, pero tienen una capacidad limitada para predecir los extremos de la distribución. La Figura 9B ilustra un modelo de regresión logística entrenado para predecir la baja estatura adulta en personas que informaron baja estatura a los 10 años. Las variables independientes incluyeron la presencia de una variante de NPR2 con actividad reducida y únicamente la puntuación poligénica. Este modelo simple puede predecir 2/3 de los verdaderos positivos, manteniendo una tasa de falsos positivos por debajo de 20%. Un modelo con únicamente una puntuación poligénica, pero sin conocer la presencia de una variante de NPR2 con actividad reducida, presentó un AUC-ROC de 0,66. En esta muestra, el 20% de los individuos informaron baja estatura a los 10 años. En la clínica, los niños con baja estatura están en el 3% inferior, por lo que un modelo similar tendría un rendimiento mucho mejor.

Los resultados en la presente muestran que se ha desarrollado un nuevo sistema de detección de variantes de NPR2 agrupado que utiliza la expresión lentviral de los genes variantes, un reportero de cGMP-GFP, un sistema de código de barras y una estrategia de detección basada en clasificación. La detección identifica con éxito las variantes LoF y GoF. La detección permitió la reclasificación de las 160 variantes sin sentido en 31 LoF, 6 GoF y 123 variantes con actividad neutra en comparación con NPR2 WT. Estos datos funcionales indican que al menos 34/100.000 individuos portan una variante de NPR2 con baja actividad que reduce la estatura. Al incorporar puntuaciones poligénicas, el método permitirá la predicción de baja estatura adulta en niños bajos que portan estas variantes. El método de alto rendimiento es ventajoso porque proporciona escalabilidad (detección de un gran número de variantes), complejidad (identifica un gran número de réplicas) y certeza (proporcionando mayor confianza en los fenotipos variantes).

Ejemplo 4. Modelo de Dosificación Basado en el Peso por CNP

Se desarrolló un modelo PPK con datos de cinco ensayos clínicos en niños con acondroplasia (0,95-15 años) que recibieron dosis diarias de vosoritida por kg. El modelo se utilizó para simular las exposiciones esperadas en niños con un régimen de dosificación por

banda de peso refinado. La exposición simulada se comparó con la exposición observada en el ensayo clínico fundamental para evaluar la idoneidad del régimen de dosificación por banda de peso.

El muestreo para el análisis farmacocinético (PK) de vosoritida se realizó como parte de 3 estudios de fase II y 2 estudios de fase III que incluyeron el uso de una dosis subcutánea diaria de 15 µg/kg. En un análisis de 2 de los mismos estudios (Chan et al., Clin Pharmacokinet. 2022 61:263–80), la concentración plasmática máxima media observada (C_{máx}) varió desde 4750 a 7180 pg/ml, el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) desde el tiempo 0 hasta el momento de la última concentración medible varió desde 175.000 a 290.000 pg-min/ml, y el tiempo medio hasta la concentración plasmática máxima varió desde 13,8 a 16,8 min después de una dosis subcutánea única de 15 µg/kg de vosoritida (Chan, *supra*). Los datos PK también demostraron una correlación positiva entre la exposición plasmática a vosoritida (AUC) y el peso corporal en pacientes tratados diariamente con una dosis por kg de vosoritida, lo que sugiere que una alternativa a la dosificación basada en el peso con vosoritida puede producir una exposición más consistente en todo el rango de peso del paciente (Chan, *supra*).

El presente estudio se diseñó para desarrollar un modelo PK poblacional (PPK) para vosoritida en niños con acondroplasia, así como para evaluar la influencia de covariables clínicamente relevantes en la farmacocinética de vosoritida con el fin de comprender mejor las fuentes de variabilidad tras la administración subcutánea. El régimen de dosificación basado en el peso original (15 µg/kg) utilizada en ensayos clínicos para vosoritida requería múltiples dosis para niños con un peso entre 10 y 83 kg. Se desarrolló un régimen de dosificación por banda de peso para vosoritida para tener en cuenta el efecto característico del peso corporal en la depuración y el volumen de distribución de vosoritida, y para garantizar una exposición más consistente al fármaco durante el tratamiento del paciente. Este régimen también permitiría reducir la necesidad de dosis y los cambios de dosis, ya que únicamente se necesitaría una nueva dosis cuando el niño progresa de un rango de peso al siguiente, lo que podría simplificar la dosificación para niños con acondroplasia y sus cuidadores. El modelo PPK se utilizó para realizar simulaciones y desarrollar las recomendaciones de dosificación.

En este análisis de PPK se incluyeron datos PK, de laboratorio y demográficos de niños con acondroplasia. Los datos se obtuvieron de cinco ensayos clínicos: el estudio 111-202 (NCT02055157), un ensayo de fase II, no aleatorizado, abierto, de cohorte secuencial y de búsqueda de dosis de vosoritida (2,5, 7,5, 15 o 30 µg/kg) administrado durante 24 meses a 35 niños (5-14 años) con acondroplasia [(Chan, *supra*), Savarirayan et al., N Engl J Med. 2019;381:25–35]; estudio 111-205 (NCT02724228), un ensayo de extensión de fase II, abierto y en curso, de vosoritida (15 o 30 µg/kg) administrado a 30 niños con acondroplasia que completaron 24 meses de tratamiento en el estudio 111-202 (Savarirayan, *supra*); estudio 111-301 (NCT03197766), un ensayo de fase III, aleatorizado, doble ciego, de asignación paralela, de eficacia y seguridad de vosoritida (15 µg/kg) administrado durante 12 meses a 121 niños (5-18

años) con acondroplasia (Chan, *supra*); estudio 111-302 (NCT03424018), un ensayo de fase III, abierto, de extensión, de seguridad y eficacia de vosoritida (15 µg/kg) administrado a niños (≥ 6 años) con acondroplasia que completaron 12 meses de tratamiento en el estudio 111-301; y estudio 111-206 (NCT03583697), un ensayo de fase II, aleatorizado, doble ciego, de asignación
 5 paralela, de seguridad y eficacia de vosoritida (15 o 30 µg/kg) administrado durante 12 meses a 75 niños (≤ 5 años) con acondroplasia; en el momento de la construcción del modelo PPK, el estudio estaba en curso, por lo que únicamente se disponía de datos provisionales de pacientes centinela para su inclusión en el desarrollo del modelo.

Los datos se agruparon en una única base de datos de Modelado de Efectos Mixtos No
 10 Lineales (NONMEM™, versión 7.4.4, ICON Development Solutions, Dublín, Irlanda). Para el modelado PPK de vosoritida, se utilizó un enfoque de transformación logarítmica de ambos lados y una aproximación estocástica de maximización de expectativas (SAEM) seguida de un método de muestreo por importancia (IMP).

El modelo PPK se desarrolló en una serie de pasos. El modelo base se creó sin considerar
 15 los efectos de las covariables y se utilizó para describir los componentes estructurales y estocásticos del modelo y para realizar una evaluación gráfica de las covariables. El modelo de covariable única se utilizó para probar gráficamente las relaciones covariable-parámetro preespecificadas utilizando covariables que se sabía que influían en la farmacocinética de vosoritida o que eran fisiológicamente plausibles. Una vez completadas todas las evaluaciones
 20 de covariable única, se construyó un modelo completo utilizando todos los modelos de covariable única que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$) y estaban bien estimados. A continuación, se realizó una eliminación regresiva en el modelo completo de covariables, eliminando una covariable del modelo a la vez. Las covariables que aumentaron la función objetivo ($p < 0,001$) se mantuvieron en el modelo final.

Los parámetros finales del modelo PPK se utilizaron para la simulación sin tener en
 25 cuenta la precisión de los parámetros. Se ejecutaron quinientas réplicas utilizando el modelo PPK para generar perfiles intensivos de concentración-tiempo durante las primeras 5 h (a intervalos de 5 min) tras la administración subcutánea de dosis estratificadas variables de vosoritida en pacientes pediátricos con un peso de 10 a 90 kg. Las simulaciones se realizaron utilizando dosis
 30 de unidades de mantenimiento de existencias (0,8 mg/ml [0,5 ml]; 0,8 mg/ml [0,70 ml]; 2 mg/ml [0,60 ml]). Se incluyeron en la simulación las dosis de retiro más altas (0,32, 0,48, 1 y 1,2 mg). Se realizó un análisis farmacocinético no compartimental (PKNCA) para calcular los valores de AUC y $C_{\max}$ en datos simulados utilizando el paquete PKNCA en R, versión 0.9.3. Las exposiciones simuladas se compararon con los datos de exposición observados del estudio 111-
 35 301. La mediana, el percentil 5 y el percentil 95 de los parámetros farmacocinéticos de la simulación se compararon con los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de los datos observados evaluados en dosis diarias de 15 µg/kg.

La base de datos final utilizada contenía 4741 observaciones de 158 pacientes de entre

0,95 a 15 años, con una edad media de 8,43 años. El peso de los pacientes varió desde 9 a 74,5 kg, con un peso inicial medio de 23,8 kg. Las dosis reales administradas durante el estudio a los pacientes cuyos datos se incluyeron en el modelo PPK fueron 2,5 µg/kg/día (6 pacientes), 7,5 µg/kg/día (12 pacientes), 15 µg/kg/día (151 pacientes) y 30 µg/kg/día (11 pacientes).

5 El modelo PPK final consistió en un sistema unicompartimental con eliminación de primer orden y absorción de primer orden en el punto de cambio, lo que permitió un cambio en el coeficiente de tasa de absorción dependiente del tiempo. Se observó que el peso corporal era un factor predictivo de CL/F y V/F del fármaco (Tabla 2).

10 **Tabla 2.** Depuración promedio (CL/F) y volumen de distribución (V/F) en el rango de peso corporal

WT (kg)	CL/F (L/h)	% de referencia	V/F (l)	% de referencia
9	35,72	75,26	7,54	41,88
20 (referencia)	47,47	100,00	17,99	100,00
40	60,75	127,99	38,30	212,87
60	70,18	147,86	59,59	331,18
74,5	75,80	159,71	75,45	419,30

15 CL/F Depuración aparente, F biodisponibilidad relativa, V/F volumen de distribución aparente, WT peso corporal

Además, se encontró que la SOLNC de 0,2 mg/ml, que únicamente se utilizó en el estudio 111-202, y la duración del tratamiento eran predictivos de la biodisponibilidad relativa (F) de vosoritida. Se estimaron errores residuales separados para los 2 tipos de ensayo. El modelo también tuvo en cuenta la IIV de CL/F, V/F y punto de cambio. Se utilizó un número de identidad de estudio secundario (SIDN) adicional para representar el ensayo clínico en el que se inscribió cada paciente, pero permitió el hecho de que los pacientes pueden haber sido inscritos en > 1 estudio. Los efectos del SIDN en la IIV de CL/F y V/F se modelaron mediante un nivel jerárquico adicional de efecto (StudyCL y StudyV). Los valores típicos de las estimaciones de los parámetros y la precisión de los parámetros (% error estándar) del modelo PPK se presentan en la Tabla 3. La precisión de los parámetros fue < 30%, con la excepción de los términos IIV de StudyCL y IIV de StudyV, porque únicamente había 3 valores de SIDN en la base de datos actual. Los valores de los parámetros típicos estimados fueron consistentes con las estimaciones medianas de los parámetros bootstrap, y los intervalos de confianza fueron tranquilizadamente estrechos y no incluyeron el valor nulo.

Tabla 3. Estimaciones de parámetros del modelo PPK

	Parámetro (unidades)	Valor típico	Error estándar (%)	Percentil 2,5 inferior de Bootstrap	Mediana	Percentil 97,5 superior de Bootstrap
5	CL/F (l/h)	47,47	1,8	40,45	47,7	57,97
	V/F (l)	17,99	3,3	15,18	18,36	23,09
	Ka1 (1/hora)	2,21	14,7	1,8	2,3	3,19
	Ka2 (1/h)	0,06	3,8	0,04	0,06	0,09
	Punto de cambio (h)	0,31	7,3	0,27	0,3	0,33
10	Error residual 1 ^a (CV, %)	66,5	1,6	61,71	66,3	72
	Error residual 2 ^b (CV, %)	61	1,5	56,61	60,85	65,4
	Efecto de SOLNC (0,2 mg/ml)	1,56	15,3	1,18	1,54	2,03
	Efecto del peso sobre CL/F	0,356	25,1	0,02	0,35	0,68
15	Efecto del peso sobre V/F	1,09	8,1	0,85	1,1	1,31
	Efecto del tiempo sobre F	0,21	8,1	0,16	0,21	0,26
	IIV de CL (CV, %)	33,6	8,3	27,3	33	40,49
	IIV de V (CV, %)	24,2	13,6	17,7	23,9	29,99
	IIV de StudyCL (CV, %)	25,7	47,4	18,51	26,15	34,6
20	IIV de StudyV (CV, %)	1,2	51,8	0,4	2,05	5,7
	Punto de cambio IIV (fijo)	22,4	0	NE	NE	NE

CL/F Depuración aparente, CV coeficiente de variación, ECL electroquimioluminiscencia, ELISA ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, F biodisponibilidad relativa, IIV variabilidad interindividual, Ka1 constante 1 de la tasa de absorción, Ka2 constante 2 de la tasa de absorción, NE no estimada, PPK farmacocinética poblacional, SOLNC concentración de la solución, StudyCL variabilidad anidada basada en el número de identificador del estudio, StudyV variabilidad anidada basada en el número de identificador del estudio, V/F volumen de distribución aparente

Error residual 1 = error residual para las concentraciones que surgen del ensayo ELISA; error residual 2 = error residual para las concentraciones que surgen del ensayo ECL

El rendimiento del modelo PPK para vosoritida se evaluó usando gráficas de bondad de ajuste diagnóstico y VPC (Figuras 12 y 13). Estos mostraron que el modelo logró describir los datos con precisión. Las distribuciones predictivas del modelo de las concentraciones medianas en diversos intervalos de tiempo se compararon con las medianas observadas usando VPC (Figura 13). Los límites inferior y superior de los datos observados y simulados fueron generalmente similares, con las concentraciones observadas dentro de los percentiles 5 y 95 de

la distribución predictiva del modelo final en todos los intervalos de tiempo.

El modelo PPK para vosoritida se utilizó para desarrollar recomendaciones de dosificación mejoradas para pacientes pediátricos con acondroplasia. Se realizaron simulaciones para diversos estratos de peso. Se identificó un régimen inicial de 4 bandas de peso: 0,32 mg para un peso de 10-19 kg, 0,48 mg para un peso de 20-34 kg, 0,7 mg para un peso de 35-64 kg y 1 mg para un peso ≥ 65 kg. Las AUC simuladas para pacientes con un peso < 65 kg estuvieron dentro o ligeramente por encima del límite superior de las AUC observadas en los estudios 111-301, 111-202 y 111-205. Sin embargo, las AUC simuladas para pacientes con un peso ≥ 65 kg excedieron el límite superior. Dados los resultados obtenidos con el régimen inicial de 4 bandas de peso, se probó un régimen de dosificación revisado. El nuevo régimen de dosificación incluyó más rangos de peso (8 en comparación con 4) para generar una exposición simulada más acorde con la exposición observada. El mejor régimen de dosificación por banda de peso identificado fue de 0,24 mg para un peso de 10-11 kg, 0,28 mg para un peso de 12-16 kg, 0,32 mg para un peso de 17-21 kg, 0,40 mg para un peso de 22-32 kg, 0,50 mg para un peso de 33-43 kg, 0,60 mg para un peso de 44-59 kg, 0,70 mg para un peso de 60-89 kg y 0,80 mg para un peso ≥ 90 kg (Tabla 4).

Tabla 4. Dosificación por banda de peso propuesta para vosoritida

Peso corporal (kg)	Concentración de SKU 1: 0,8 mg/ml (0,50 ml)	Concentración de SKU 2: 0,8 mg/ml (0,70 ml)	Concentración de SKU 3: 2 mg/ml (0,60 ml)
10–11	0,24 mg/0,30 ml (22–24 $\mu\text{g/kg}$)		
12–16		0,28 mg/0,35 ml (18–23 $\mu\text{g/kg}$)	
17–21		0,32 mg/0,40 ml (15–19 $\mu\text{g/kg}$)	
22–32		0,40 mg/0,50 ml (13–18 $\mu\text{g/kg}$)	
33–43			0,50 mg/0,25 ml (12–15 $\mu\text{g/kg}$)
44–59			0,60 mg/0,30 ml (10–14 $\mu\text{g/kg}$)
60–89			0,70 mg/0,35 ml (8–12 $\mu\text{g/kg}$)
≥ 90			0,80 mg/0,40 ml (≤ 9 $\mu\text{g/kg}$)

El régimen propuesto incluye dosis < 15 $\mu\text{g/kg}$ para pacientes que pesan ≥ 44 kg, y dosis

> 15 µg/kg para pacientes que pesan 10-16 kg. Se encontró que el nuevo régimen de dosificación por banda de peso producía una exposición más consistente en todo el rango de peso corporal. Los percentiles 5 al 95 de las AUC simuladas estaban dentro del rango de las AUC observadas a 15 µg /kg, y los valores medianos de AUC simulados se distribuyeron alrededor de la mediana de AUC observada (Figura 14). Además, los valores medianos de C_{máx} simulada fueron generalmente consistentes con la C_{máx} observada a 15 µg /kg, pero los percentiles 5 y 95 de la C_{máx} simulada fueron inferiores a los percentiles 5 y 95 de la C_{máx} observada (Figura 15). Esta discrepancia se puede atribuir a que el modelo subestima C_{máx} como se muestra en los gráficos VPC, y también podría ser el resultado de que la simulación se realizó con únicamente 1 SIDN en lugar de los 3 SIDN presentes en el modelo.

El modelo PPK se utilizó para simular las concentraciones y exposiciones al fármaco con el objetivo de desarrollar un régimen de dosificación por rango de peso más refinado. Aunque inicialmente se propuso un régimen de 4 rangos de peso, se logró una mayor consistencia entre las exposiciones simuladas y observadas con 8 rangos de peso. El régimen por rango de peso proporcionó una exposición al fármaco más consistente en todo el rango de peso corporal. Específicamente, para pacientes con un peso > 44 kg, se propusieron dosis < 15 µg/kg para explicar la correlación entre la exposición observada por relación no lineal y el peso corporal del paciente. De manera similar, para niños de 2 a 5 años o pacientes con un peso de 10-16 kg, se propusieron dosis > 15 µg/kg para evitar una exposición subóptima y considerar un enfoque de extrapolación. La dosis de 30 µg/kg se ha probado en los estudios de fase II (estudios 111-202, 111-205 [(Chan, *supra*), Savarirayan *supra*], y 111-206) y demostró un perfil de seguridad similar a la dosis de 15 µg/kg.

La exposición simulada del régimen de dosificación propuesto de 8 bandas de peso se situó dentro del rango que se ha demostrado que es bien tolerado y efectivo en estudios previos (Chan, *supra*). Cabe destacar que el régimen de bandas de peso propuesto garantizará una exposición más consistente a vosoritida, tanto en la población de pacientes como a lo largo del tratamiento individual, a la vez que simplifica la dosificación para niños con acondroplasia y sus cuidadores.

Ejemplo 5: Mejora de la resistencia ósea usando CNP

El objetivo principal de este estudio fue determinar si la variante de CNP afecta tanto la longitud como el desarrollo de la fuerza ósea en niños con acondroplasia utilizando mediciones del segundo metacarpiano.

Este estudio incluyó 103 radiografías AP de mano/muñeca anonimizadas de 30 niños con acondroplasia (13 hombres, 17 mujeres; edades de 7,8-16 años). Los datos patentados incluyeron radiografías de mano recolectadas en cuatro puntos temporales: en la semana 104 (al pasar al estudio de extensión de fase II), semana 156, semana 208 y semana 260 del tratamiento. Se midieron la longitud del segundo metacarpiano y la anchura de la diáfisis media,

el grosor cortical, la robustez (área total/longitud) y el área cortical (correlacionada con la fuerza). Las mediciones se compararon con 378 radiografías de 114 controles de estatura promedio (61 hombres, 53 mujeres; edades de 6-16 años) mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

5 Los niños con acondroplasia en la semana 208 y la semana 260 de tratamiento demostraron metacarpianos más largos con mayor área cortical y grosor cortical en comparación con la semana 104 (todos $p < 0,05$). No se observaron cambios significativos en la RCA ni en la robustez en los distintos momentos del tratamiento (Tabla 5). Además, no se observaron diferencias entre hombres y mujeres con acondroplasia en ninguno de los momentos. En
10 comparación con el grupo control, los niños con acondroplasia presentaron mayor robustez y área cortical a lo largo del tratamiento ($p < 0,001$).

Tabla 5: Medidas del segundo metacarpiano (media $\pm$ SD) en cada punto temporal del tratamiento.

	Valor inicial (n = 29)	Semana 52 (n = 29)	Semana 104 (n = 28)	Semana 156 (n = 17)	Controles (n = 378)
					56,83
15 Le (mm)	39,75 $\pm$ 4,49 $\ddagger^{\wedge^{\circ}}$	42,13 $\pm$ 4,36 $^{\circ}$	44,12 $\pm$ 4,56 $^{*\circ}$	45,00 $\pm$ 4,98 $^{*\circ}$	$\pm$ 9,40 $^{*}\#\ddagger^{\wedge}$
T. Ar					
20 (mm²)	42,84 $\pm$ 11,82 $^{\wedge}$	45,79 $\pm$ 12,49 $^{\circ}$	49,80 $\pm$ 14,63 $^{\circ}$	54,29 $\pm$ 17,64 $^{*\circ}$	39,01 $\pm$ 11,79 $\#\ddagger^{\wedge}$
Ct.Ar					
(mm²)	25,60 $\pm$ 6,59 $\ddagger^{\wedge^{\circ}}$	28,12 $\pm$ 6,72 $^{\wedge}$	32,06 $\pm$ 7,93 *	35,60 $\pm$ 9,59 $^{*}\#^{\circ}$	29,64 $\pm$ 9,57 $^{*}\wedge$
Área de la					
médula					
25 ósea					
(mm²)	17,24 $\pm$ 9,38 $^{\circ}$	17,67 $\pm$ 10,54 $^{\circ}$	17,73 $\pm$ 12,15 $^{\circ}$	18,68 $\pm$ 12,06 $^{\circ}$	9,37 $\pm$ 4,81 $^{*}\#\ddagger^{\wedge}$
Espesor					
cortical					
(mm)	1,39 $\pm$ 0,35 $\ddagger^{\wedge^{\circ}}$	1,49 $\pm$ 0,37 $^{\circ}$	1,67 $\pm$ 0,43 $^{*\circ}$	1,77 $\pm$ 0,41 $^{*\circ}$	1,10 $\pm$ 0,35 $^{*}\#\ddagger^{\wedge}$
30 RCA	0,61 $\pm$ 0,12 $^{\circ}$	0,63 $\pm$ 0,12 $^{\circ}$	0,66 $\pm$ 0,12 $^{\circ}$	0,67 $\pm$ 0,12 $^{\circ}$	0,76 $\pm$ 0,10 $^{*}\#\ddagger^{\wedge}$
T.Ar/Le					
(mm)	1,08 $\pm$ 0,30 $^{\circ}$	1,09 $\pm$ 0,29 $^{\circ}$	1,13 $\pm$ 0,32 $^{\circ}$	1,20 $\pm$ 0,37 $^{\circ}$	0,68 $\pm$ 0,13 $^{*}\#\ddagger^{\wedge}$

*significativamente diferente ($p < 0,05$) del valor inicial, #significativamente diferente ($p < 0,05$) de w52, $\ddagger$ significativamente diferente ($p < 0,05$) de w104, $^{\wedge}$ significativamente diferente ($p < 0,05$) de w156, $^{\circ}$ significativamente diferente ($p < 0,05$) de los controles $^{\circ}$

Se tomaron mediciones adicionales en las semanas 208 y 260. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y Figuras 16A-B.

Tabla 6. Medidas del segundo metacarpiano (media $\pm$ SD) en cada punto temporal del tratamiento.

		Valor inicial (n=17)	Semana 104 (n=29)	Semana 156 (n=20)	Semana 208 (n=28)	Semana 260 (n=17)	Controles (n=378)
5	Le (mm)	35,71 $\pm$ 4,51° [■]	39,75 $\pm$ 4,49°	42,13 $\pm$ 4,36°	44,12 $\pm$ 4,56°*	45,00 $\pm$ 4,98°*	56,83 $\pm$ 9,40* [‡] [^]
	T. Ar (mm²)	39,30 $\pm$ 12,04 [‡] [#]	42,84 $\pm$ 11,82 [■]	45,79 $\pm$ 12,49°*	49,80 $\pm$ 14,63°*	54,29 $\pm$ 17,64°* [#]	39,01 $\pm$ 11,79 [‡] [^]
	Ct.Ar (mm²)	21,80 $\pm$ 6,29 [‡] [#] [^]	25,60 $\pm$ 6,59° [^]	28,12 $\pm$ 6,72 [■]	32,06 $\pm$ 7,93* [#]	35,60 $\pm$ 9,59°* [‡]	29,64 $\pm$ 9,57* [#]
	Área de la médula ósea (mm²)	17,50 $\pm$ 7,84°	17,24 $\pm$ 9,38°	17,67 $\pm$ 10,54°	17,73 $\pm$ 12,15°	18,68 $\pm$ 12,06°	9,37 $\pm$ 4,81* [‡] [^]
10	Espesor cortical (mm)	1,20 $\pm$ 0,27 [■]	1,39 $\pm$ 0,35°	1,49 $\pm$ 0,37°	1,67 $\pm$ 0,43°	1,77 $\pm$ 0,41°*	1,10 $\pm$ 0,35* [‡] [^]
	RCA	0,57 $\pm$ 0,10° [^]	0,61 $\pm$ 0,12°	0,63 $\pm$ 0,12°	0,66 $\pm$ 0,12°*	0,67 $\pm$ 0,12°*	0,76 $\pm$ 0,10* [‡] [^]
	T.Ar/Le (mm)	1,10 $\pm$ 0,30°	1,08 $\pm$ 0,30°	1,09 $\pm$ 0,29°	1,13 $\pm$ 0,32°	1,20 $\pm$ 0,37°	0,68 $\pm$ 0,13* [‡] [^]

* significativamente diferente (p<0,05) que la detección,

15 # significativamente diferente (p<0,05) que w104,

‡ significativamente diferente (p<0,05) que w156,

^ significativamente diferente (p<0,05) que w208,

■ significativamente diferente (p<0,05) que w260,

° significativamente diferente (p<0,05) que los controles

20 Se observó que 2-3 años adicionales de tratamiento con vosoritida se asociaron con aumentos en la longitud ósea en comparación con el punto de tiempo inicial (semana 104), así como aumentos en el área cortical metacarpiana, que se correlaciona con la fuerza. Este estudio sugirió que este tratamiento de alargamiento óseo no afectó negativamente la fuerza ósea en niños con acondroplasia. La falta de una diferencia significativa en la robustez después del

25 tratamiento indicó que la expansión perióstica continuó hacia afuera a un ritmo que mantiene la robustez, permitiendo que el hueso permanezca fuerte a medida que se alarga. Es necesario realizar trabajos futuros que comparen a niños con acondroplasia tratados y no tratados para confirmar de forma más rigurosa si el tratamiento no afectó negativamente el desarrollo de la fuerza ósea. En general, este trabajo puede tener importantes implicaciones clínicas en términos

30 de opciones de tratamiento para niños con acondroplasia.

Se espera que los expertos en la materia puedan realizar numerosas modificaciones y variaciones en la descripción, tal como se describe en los ejemplos ilustrativos anteriores. Por consiguiente, únicamente se deben imponer a la descripción las limitaciones que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.