

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 457**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16	(2006.01) C07K 7/00	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
C12Q 1/42	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
C12P 21/06	(2006.01) A61P 19/00	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01) C07K 14/58	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01) A61K 47/48	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	
A61K 38/10	(2006.01)	
C07K 14/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2010 PCT/US2010/035586**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10135541**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10778389 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2432489**

54 Título: **Variantes de péptido natriurético de tipo C**

30 Prioridad:

20.05.2009 US 180112 P
23.10.2009 US 254563 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2017

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US

72 Inventor/es:

WENDT, DANIEL, J.;
AOYAGI-SCHARBER, MIKA;
LONG, SHINONG;
VELLARD, MICHEL, CLAUDE;
CASTILLO, SIANNA;
OKHAMAFE, AUGUSTUS, O. y
PRICE, CHRISTOPHER, P.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Marta

ES 2 608 457 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de péptido natriurético de tipo C

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Campo de la divulgación

10 El campo de la divulgación se refiere, en general, a variantes de péptido natriurético de tipo C (CNP), composiciones que comprenden variantes de CNP, métodos para preparar variantes de CNP, y métodos para usar variantes de CNP para tratar trastornos que responden a CNP, que incluyen, pero no se limitan a trastornos relacionados con los huesos tales como displasias esqueléticas (por ejemplo, acondroplasia) y trastornos del músculo liso vascular.

15 Antecedentes de la divulgación

La familia de péptidos natriuréticos consiste en tres péptidos relacionados estructuralmente: péptido natriurético atrial (ANP) (n.º de Registro en GenBank NP_006163, para la proteína precursora de ANP, NPPA), péptido natriurético cerebral (BNP) (n.º de Registro en GenBank NP_002512, para la proteína precursora de BNP, NPPB), y péptido natriurético de tipo C (CNP) (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990) (n.º de Registro en GenBank NP_077720, para la proteína precursora de CNP, NPPC) (J. Hypertens., 10: 907-912 (1992)). Estos péptidos de una sola cadena, pequeños (ANP, BNP, CNP) tienen una estructura de bucle de 17 aminoácidos (Levin *et al.*, N. Engl. J. Med., 339: 863-870 (1998)) y desempeñan papeles importantes en múltiples procesos biológicos. ANP y BNP se unen y activan el péptido natriurético receptor A (NPR-A), también denominado guanilil ciclasa A (GC-A), dando como resultado niveles más elevados de monofosfato de guanosina cíclico intracelular (cGMP). De forma análoga, CNP interactúa con NPR-B (GC-B) para estimular la generación de cGMP (J. Hypertens., 10: 1111-1114 (1992)). Un tercer tipo de receptor, NPR-C, se une a cada uno de los péptidos natriuréticos con afinidad elevada y funciona principalmente para capturar los péptidos del compartimento extracelular y depositar los péptidos en lisosomas, en los que se degradan (Science, 238: 675-678 (1987)). ANP y BNP se producen principalmente dentro de las células del músculo cardíaco, a y se cree que desempeñan papeles importantes en la homeostasis cardiovascular (Science, 252: 120-123 (1991)). CNP se expresa más ampliamente, incluyendo en el sistema nervioso central, tracto reproductor, huesos y endotelio de los vasos sanguíneos (Hypertension, 49: 419-426 (2007)).

En seres humanos, el CNP se produce inicialmente a partir del gen del precursor de péptido natriurético C (NPPC) como un polipéptido pre-pro de 126 aminoácidos de una sola cadena (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990)). La retirada del péptido señal produce pro-CNP, y la escisión adicional por la endoproteasa furina genera un péptido activo de 53 aminoácidos (CNP-53), que se secreta y escinde de nuevo por una enzima desconocida para producir el péptido maduro de 22 aminoácidos (CNP-22) (Wu, J. Biol. Chem. 278: 25847-852 (2003)). CNP-53 y CNP-22 se diferencian en su distribución, con CNP-53 predominando en tejidos, mientras que CNP-22 se encuentra principalmente en plasma y líquido cefalorraquídeo (J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res. 26: 269-297 (2006)). Se desconoce la forma de CNP predominante en el cartílago. Tanto CNP-53 como CNP-22 se unen de forma similar a NPR-B. Además, ambos inducen la producción de cGMP de una manera dependiente de la dosis y similar (VT Yeung, Peptides, 17: 101-106 (1996)).

45 Anteriormente se han descrito genes y polipéptidos de CNP naturales. El documento de patente de Estados Unidos n.º 4.352.770 desvela CNP-22 aislado y purificado de cerebro porcino con una secuencia idéntica a la del CNP humano y su uso en el tratamiento de indicaciones cardiovasculares. El documento de patente de Estados Unidos n.º 6.034.231 desvela el gen humano y polipéptido de proCNP (126 aminoácidos) y el gen y polipéptido CNP-53 humano.

50 La eliminación de CNP del espacio extracelular se produce a través de la acción de la endopeptidasa neutra unida a la membrana (NEP), que rápidamente degrada a CNP (Biochem. J., 291 (Pt 1): 83-88 (1993)), y a través de NPR-C, que se une y deposita CNP en lisosomas, en los que CNP se degrada. Se ha demostrado que CNP tiene una semivida *in vivo* de 2,6 min en el ser humano normal (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). La baja concentración en plasma de CNP (J. Bone Miner. Res., 19 (Supl. 1) S20 (2004)) y su coexpresión con NPR-B en una serie de tejidos sugiere que CNP funciona principalmente a través de un autocrino/paracrino.

60 Como se ha indicado anteriormente, el CNP se une y activa el receptor de péptido natriurético B (NPR-B), también denominado guanilil ciclasa B (GC-B), dando como resultado niveles más elevados de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) intracelular. La señalización cadena abajo mediada por la generación de cGMP influye en una matriz diversa de procesos biológicos que incluyen la osificación endocondral. Por consiguiente, los niveles elevados o disminuidos de cualquiera de los componentes de esta ruta pueden conducir a un crecimiento óseo anómalo. Por ejemplo, la supresión genética de cualquiera de CNP o NPR-B en modelos de ratón da como resultado animales que tienen un fenotipo de enanismo con huesos largos y vértebras más cortos. Se han identificado mutaciones en NPR-B humano que bloquean la señalización apropiada de CNP y dan como resultado enanismo (Olney, *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 91(4): 1229-1232 (2006); Bartels, *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 75: 27-34 (2004)). Por el contrario, los ratones diseñados por ingeniería para producir niveles elevados de CNP presentan huesos largos y vértebras

alargados.

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 cartílagos. Normalmente el FGFR-3 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 de FGFR-3 es constitutivamente activa, lo que conduce a un acortamiento severo de los huesos. Parece que tanto la proliferación como la diferenciación de condrocitos están alteradas, lo que da lugar a un cartílago de placas de crecimiento notablemente corto (P. Krejci *et al.*, J. Cell Sci. 118: 5089-5100 (2005)). La osificación endocondral es el proceso que rige el crecimiento longitudinal de los huesos largos. Existen cuatro zonas de la placa de crecimiento: en reposo, proliferativa, hipertrófica y zona de calcificación. En la placa de crecimiento, NPR-B se expresa por células proliferativas mientras que NPR-C se expresa por células hipertróficas (Yamashite *et al.*, J. Biochem. 127: 177-179 (2000)). En el crecimiento del hueso endocondral normal, los condrocitos se organizan en columnas y proliferan en la zona proliferativa de la placa de crecimiento. Estas columnas están desorganizadas en pacientes con acondroplasia. Además, la zona hipertrófica es en la que las células se hacen grandes y opcionalmente producen apoptosis (lisis), lo que conduce a la invasión y mineralización de osteocitos. Los condrocitos hipertróficos y el tamaño total de la zona son mucho más pequeños en los pacientes con acondroplasia que en los pacientes normales. CNP es un agonista de NPR-B, un regulador positivo de los condrocitos y el crecimiento óseo. La señalización cadena abajo de CNP/NPR-B inhibe la ruta de FGFR-3 al nivel de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP K). La inhibición en MAP K estimula la proliferación y diferenciación de los condrocitos en las zonas proliferativa e hipertrófica de la placa de crecimiento, dando como resultado crecimiento óseo.

En seres humanos, las mutaciones activadoras de FGFR-3 son la causa principal del enanismo genético. Los ratones que tienen FGFR-3 activado sirven como un modelo de acondroplasia, la forma más común de las displasias esqueléticas, y la sobreexpresión de CNP rescata a estos animales del enanismo. Por consiguiente, CNP y variantes funcionales de CNP son agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de las diversas displasias esqueléticas.

En la actualidad, el uso terapéutico de CNP está limitado por su corta semivida en plasma, que en seres humanos se ha demostrado que es de 2,6 minutos *in vivo* (J Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). Para aumentar la concentración de CNP por encima de los niveles intrínsecos (aproximadamente 5 pM) encontrados, por lo general, en plasma humano, en todos los estudios en seres humanos y animales fue necesaria una infusión continua usando CNP administrado por vía sistémica. Una variante de CNP que tiene una semivida en suero *in vivo* más larga y que presenta una actividad similar o mejorada con respecto a la del CNP de tipo silvestre (wt) es importante para una estrategia terapéutica sostenible. Dos mecanismos por los cuales la semivida de CNP se reduce en plasma humano son la degradación por la endopeptidasa neutra (NEP) y la eliminación por el receptor de péptido natriurético C (NPR-C) (Growth Horm. & IGF Res., 16: S6-S14 (2006)). Según se informa, las modificaciones de péptidos pueden aumentar la resistencia a endopeptidasas y la escisión de exopeptidasas (Amino Acids, 30: 351-367 (2006); Curr. Opin. Biotech., 17: 638-642 (2006)).

El documento EP0497368 desvela (página 14, líneas 7-10, reivindicaciones 1-2, tabla 2: compuestos 3 y 5 y CNP-22) variantes de CNP que comprenden la SEQ ID n.º: 178 y su uso para el tratamiento de reestenosis y arteriosclerosis.

Se han evaluado las actividades biológicas de diversos análogos y derivados de CNP. Al sustituir S-metil Cys en lugar tanto de Cys₆ como de Cys₂₂, se demostró que supuestamente el ciclado del péptido a través de un enlace disulfuro Cys₆-Cys₂₂ es importante para la actividad de CNP en la estimulación de la formación de cGMP (Biochem. Biophys. Res. Comm., 183: 964-969 (1992), usando también barrido de alanina para identificar aminoácidos importantes para la funcionalidad de CNP). Un aumento adicional significativo de la actividad resulta supuestamente de la presencia combinada de los aminoácidos Leu₉, Lys₁₀, y Leu₁₁. El documento de patente de Estados Unidos n.º 4.434.133 describe análogos de CNP que comprenden CNP-22 con sustituciones en la posición 6, 7, 9, 11 o 22 del aminoácido, en los que el aminoácido se selecciona entre Cys o Pmp (ácido pentaciclomercaptopropiónico) en la posición 6, Phe, 4-cloro-Phe, 4-fluoro-Phe, 4-nitro-Phe, o Cha (3-ciclohexil-Ala) en la posición 7, Gly, Val, Aib, o tLeu en la posición 9, Leu o Ile en la posición 11, y Cys o Pmp en la posición 22.

La Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0138134 (ahora documento de patente de Estados Unidos n.º 7.276.481) describe variantes de CNP que comprenden los aminoácidos Cys₆ a Cys₂₂ de CNP-22 ("CNP-17") que incluyen al menos una sustitución para otro aminoácido natural en las posiciones 9, 10, 11, 16, 17, 19, o 20, variantes de CNP con inserciones y deleciones, tales como adición de un resto de His en el sitio principal informado de escisión con NEP, entre Cys₆ y Phe₇, y métodos de uso de tales variantes para aumentar el tamaño de una placa de crecimiento óseo en hueso anómalo y alargamiento de un hueso anómalo. Sin embargo, no se obtuvieron aumentos significativos en la actividad tal como se mire mediante la producción de cGMP para estas variantes, y la actividad disminuyó para casi todas las variantes, como se observó en un método basado en células *in vitro* (Ejemplo 7). Además no se proporcionaron datos de soporte, tales como por ejemplo estabilidad *in vitro* o determinación del aumento de la farmacocinética (PK) para confirmar la resistencia a NEP y la resistencia a NPR-C afirmadas de los análogos de CNP. El documento de patente de Estados Unidos n.º 6.743.425 desvela sustancias

para el tratamiento de la acondroplasia que activan NPR-B/GC-B y son péptidos o compuestos de bajo peso molecular, que incluyen los péptidos natriuréticos de tipo C, CNP-22 y CNP-53, La publicación de PCT n.º WO 94/20534 desvela una quimera de CNP-22 y el extremo C-terminal de 5 aminoácidos de ANP designado como el péptido vasonatrina (VNP), un número limitado de sustituciones de aminoácidos y péptidos quiméricos cíclicos que resultan de la formación de un enlace disulfuro o doble enlace.

Los enfoques para aumentar la semivida de otros miembros de la familia de péptidos natriuréticos incluyen la disminución de la afinidad de ANP con respecto a NPR-C (documento de patente de Estados Unidos n.º 4.846.932), usando antagonistas pentapeptídicos de NPR-C (documento WO 00/61631) y coadministración de Inhibidores de NEP tales como tiorfano y Candoxatril (Clin. Exp. Pharma. Physiol., 25: 986-991 (1997), Hyperten., 30: 184-190 (1997)). El documento WO 2004/047871 describe conjugados de BNP y variantes de BNP para restos de polialquilenglicol, restos de azúcar, restos de polisorbato, restos policatiónicos y otros restos de polímero hidrófilo que supuestamente presentan una semivida mejorada en circulación y supuestamente son útiles para el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda congestiva.

Sin embargo no se han publicado informes con respecto a una estrategia satisfactoria para hacer a CNP resistente a NEP a la vez que mantiene su funcionalidad.

Sumario de la divulgación

La presente invención se refiere a una variante de péptido natriurético de tipo C (CNP) reivindicada en la reivindicación 1,

En el presente documento se enseñan variantes de péptido natriurético de tipo C (CNP) que son útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, acondroplasia) y trastornos del músculo liso vascular. La divulgación incluye variantes de CNP que tiene un aumento de la semivida en suero, por ejemplo como resultado de la capacidad reducida para unirse a endopeptidasa neutra (NEP), mayor resistencia a la proteólisis o NEP y/o afinidad reducida a la eliminación del péptido natriurético receptor C (NPR-C), a la que se retiene la funcionalidad de CNP.

La secuencia de tipo silvestre del CNP-22 humano (denominado "hCNP22", "wtCNP22" o "CNP22" en el presente documento) se expone a continuación:

(extremo N-terminal)

Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₄-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-Lys₁₀-Leu₉-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂ (SEQ ID NO: 1).

Las posiciones de 6 a 22 de CNP22 forman un dominio cíclico por medio de un enlace disulfuro entre Cys₆ y Cys₂₂. Se ha mostrado que la estructura cíclica de 17 aminoácidos es importante para la unión de CNP a NPR-B (Schiller, Biochem. Biophys. Res. Commun., 138: 880-886 (1986)). La secuencia de aminoácidos de las posiciones 6 a 22 de CNP22 se denomina "CNP17" en el presente documento (SEQ ID NO: 2).

El CNP es susceptible a la escisión con NEP en un número de sitios: Cys₆-Phe₇, Gly₈-Leu₉, Lys₁₀-Leu₁₁, Arg₁₃-Ile₁₄, Ser₁₆-Met₁₇ y Gly₁₉-Leu₂₀. En una realización, la divulgación incluye una variante de CNP que (1) se modifica para aumentar su tamaño o peso molecular total, por ejemplo, hasta un intervalo de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 4 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 5 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 6 kDa, 6,2 kDa, 6,4 kDa, o a aproximadamente 7 kDa, 7,2 kDa o aproximadamente 8,2 kDa, y/o (2) se modifica en ciertas posiciones del aminoácido para reducir su susceptibilidad a la escisión con NEP en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o todos los sitios enumerados anteriormente. El tamaño o peso molecular de la variante de CNP puede aumentar por diversos medios, por ejemplo, por conjugación de aminoácidos adicionales y/o otros tipos de grupos químicos (por ejemplo, poliméricos naturales o sintéticos) a la secuencia péptica en, por ejemplo, el extremo N-terminal, el extremo C-terminal y/o cadena o cadenas laterales, y/o usando aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y/o peptidomiméticos con cadenas laterales más voluminosas. La variante de CNP se conjuga opcionalmente otros restos funcionales o estructurales. Opcionalmente, en combinación con cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento, se pueden introducir mutación o mutaciones (por ejemplo, sustitución o sustituciones, adición o adiciones, y/o delección o delecciones) en cierta o ciertas posiciones de CNP22 para reducir la afinidad de las variantes de CNP a NPR-C. Se pueden realizar modificaciones adicionales e influir en la resistencia a NEP o la actividad de CNP, por ejemplo, sustituciones conservativas, otras modificaciones conocidas en la técnica.

La variante de CNP se puede representar con la fórmula general: (x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-Lys₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 5), en la que:

la variante de CNP comprende uno o más aminoácidos modificados, que pueden dar como resultado enlaces peptídicos modificados (por ejemplo, a través del uso de isoésteres de enlace peptídico), en la posición que corresponde a uno o más de los siguientes restos de CNP: Gly₁, Lys₄, Gly₅, Cys₆, Phe₇, Gly₈, Leu₉, Lys₁₀, Leu₁₁, Ile₁₄, Gly₁₅, Ser₁₆, Met₁₇, Gly₁₉, Leu₂₀ y Gly₂₁; y

(x) y (z) independientemente pueden estar ausentes o pueden ser una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un polipéptido natriurético (por ejemplo, NPPC, ANP, BNP) o un polipéptido no natriurético (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), IgG, etc.).

5 La variante de CNP incluye: (1) una modificación en una posición del aminoácido que corresponde a una de las posiciones 6, 7 o 8 (Cys6, Phe7 o Gly8) de CNP22, (2) opcionalmente delección, adición y/o sustitución de cualquiera o todos los aminoácidos en las posiciones 1-5 (Gly1, Leu2, Ser3, Lys4, y Gly5) y (3) opcionalmente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones adicionales (delecciones, adiciones y/o sustituciones) en posiciones que corresponden a las posiciones 6-22, de las cuales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pueden ser sustituciones conservativas u otra sustituciones descritas en el presente documento o conocidas en la técnica.

15 Se entiende que una referencia a una posición del aminoácido en particular mediante un número (por ejemplo, posición 7 de CNP22) se refiere a la posición del aminoácido correspondiente en cualquier variante de CNP, incluso si el número de la posición en esa variante de CNP ha cambiado debido a inserciones o delecciones precedentes. Por ejemplo, una referencia a la "posición 7" o "Phe7" podría hacer referencia a la posición 2 correspondiente para una variante de CNP en la que se ha hecho una delección de los primeros cinco aminoácidos. De forma análoga, una referencia a la "posición 7" podría hacer referencia a la posición 8 correspondiente para una variante de CNP en la que se ha añadido un aminoácido al extremo N-terminal.

20 Una variante de CNP se puede ciclar a través de un enlace covalente entre posiciones que corresponden a 6 y 22 de CNP22. Se contempla que el enlace covalente se forma usando cualquier método conocido en la técnica. En otra realización, la variante de CNP se puede ciclar a través de un enlace covalente formado entre un aminoácido en o hacia el extremo N-terminal y un aminoácido en o hacia el extremo C-terminal (denominados aminoácidos "terminales" para este fin) del péptido. En una realización, el enlace covalente se forma entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos terminales o los aminoácidos en posiciones que corresponden a 6 y 22 de CNP22. En otra realización, el enlace covalente se forma entre la cadena lateral de un aminoácido terminal y el grupo terminal del otro aminoácido terminal, o entre los grupos terminales de cada aminoácido terminal. Por ejemplo, para el enlace covalente formado entre los aminoácidos terminales o entre los aminoácidos en posiciones que corresponden a 6 y 22 de CNP22, son posibles enlaces de cabeza a cola, cadena lateral a cadena lateral, cadena lateral a cabeza, o cadena lateral a cola.

35 Una variante de CNP puede tener una afinidad reducida con respecto a NEP, y/o una resistencia más elevada a la escisión o NEP y/o un aumento de la semivida en suero *in vivo*, a la vez que se retiene la funcionalidad de CNP (por ejemplo, estimulación de la producción de cGMP). Preferentemente, NEP reconoce sustratos con tamaño inferior a aproximadamente 3 kDa, debido al tamaño limitado de su cavidad del sitio activo (Oefner, J. Mol. Biol., 296: 341-349 (2000)). Las variantes de CNP se pueden modificar para aumentar su peso molecular total hasta un intervalo de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 4, 4,6, 5, 4,2, 4,8, 6, 6,4 o 7 kDa, por ejemplo, por adición de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 5 kDa de aminoácidos, polímeros hidrófilos o solubles en agua, ácidos hidrófobos (incluyendo ácidos grasos), y/o carbohidratos. Las variantes de CNP pueden tener un peso molecular entre aproximadamente 2,6 kDa y aproximadamente 7 kDa, o entre aproximadamente 2,8 kDa y 6 kDa, o entre aproximadamente 2,8 kDa y aproximadamente 4,8 kDa. En ciertas realizaciones, se añaden al menos aproximadamente 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6 o 1,8 kDa, o hasta 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 o 5 kDa, para aumentar el peso molecular total de la variante de CNP, por ejemplo, hasta un intervalo de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa hasta aproximadamente 4 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 5 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 6 kDa, 6,2 kDa, 7,2 kDa, 8,2 kDa o más elevado. Tales variantes de CNP comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica homóloga en al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % a los aminoácidos 6-22 de CNP22. En otras realizaciones, tales variantes de CNP comprenden una sustitución, inserción o delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos con otro aminoácido o peptidomimético natural o no natural. Aunque ambas sustituciones o inserciones conservativas y no conservativas se conciben en cualquier posición, la introducción de modificaciones puede comenzar, por ejemplo, mediante sustituciones conservativas en regiones que en la técnica se han identificado como implicadas en la actividad de CNP o en la unión a NPR-B, aunque se pueden preparar sustituciones no conservativas en esas regiones que previamente se ha mostrado que son tolerantes a la modificación.

55 Las variantes de CNP pueden comprender un CNP que tenga una parte ciclada intacta a entre Cys6 y Cys22, y colas N-terminales y/o C-terminales que contienen aproximadamente 1-40, 1-20, 5-40, 5-35, 10-35, 15-35, 5-31, 10-31, o 15-31 aminoácidos y son fragmentos obtenidos a partir de un polipéptido CNP y/o un polipéptido que no es CNP. En una realización, tales variantes de CNP tienen un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 2,8 kDa a aproximadamente 4, 4,6, 5, 4,2, 4,8, 6, 6,4 o 7 kDa. Los ejemplos no limitantes de tales variantes de CNP incluyen CNP22 de tipo silvestre o CNP22 con una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de K4R), que tienen una prolongación N-terminal y/o C-terminal obtenida a partir de secuencias precursoras de péptido natriurético (por ejemplo, ANP, BNP o CNP) de ser humano u otra especie, una variante de precursor de péptido natriurético C (NPPC) con sustituciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos (por ejemplo, las variantes de CNP pueden ser truncamientos de CNP-53 que dan como resultado péptidos con un peso molecular entre aproximadamente 2,8 kDa y 4,8 kDa), u otros polipéptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, albúmina de suero o proteína de IgG (por ejemplo, las variantes de CNP pueden ser quimeras de CNP que contengan

fragmentos de albúmina de suero o IgG de ser humano u otra especie).

Las variantes de CNP pueden tener una masa total caracterizada por los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, diseñadas para aumentar la resistencia a la degradación de NEP, se representan con la fórmula general:

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(b)₄-Gly₅-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-(h)₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 6), en la que:

(x) es un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es el polietilenglicol (PEG, también denominado óxido de polietileno (PEO)), y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos que contiene de 1 a 35 aminoácidos y que se obtiene a partir de NPPC o variantes del mismo con sustituciones y/o deleciones, ANP, BNP, u otros (poli) péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, albúmina de suero, IgG, glicoproteínas ricas en histidina, fibronectina, fibrinógeno, polipéptidos que contienen dedos de cinc, osteocrina o factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2);

(z) puede estar ausente o puede ser un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es PEG, y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un polipéptido natriurético (por ejemplo, NPPC, CNP, ANP o BNP) o polipéptido no natriurético (por ejemplo, albúmina de suero o IgG); y

(b) y (h) independientemente pueden ser cada uno la Lys de tipo silvestre en esa posición o se pueden sustituir con una sustitución de aminoácido conservativa o cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, (Cit), Gin, Glu o Ser. En una realización, (b) es Arg. En otra realización, para un aumento de la resistencia a NEP, (b) no es Gly. En otra realización más, (h) no es Arg.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de NPPC o variantes del mismo enseñadas en el presente documento incluyen:

Arg,
Glu-Arg,
Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 7),
Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID NO: 8),
Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (SEQ ID NO: 9),
Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (SEQ ID NO: 10),
Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (SEQ ID NO: 11),
Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (SEQ ID NO: 12),
Gly-Ala-Asn-Arg-Met (SEQ ID NO: 13),
Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (SEQ ID NO: 14),
Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (SEQ ID NO: 15),
Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala (SEQ ID NO: 16),
Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg (SEQ ID NO: 17),
Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (SEQ ID NO: 18),
Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 19),
Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg, (SEQ ID NO: 20)
Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 21), y
Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-G1n-G1u-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID NO: 22).

Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de polipéptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, ANP, BNP, albúmina de suero e IgG incluyen:

Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (SEQ ID NO: 23);
Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 24);
Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 25);
Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26);
Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 27);
Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (SEQ ID NO: 28);
Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (SEQ ID NO: 29);
Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (SEQ ID NO: 30);
Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (SEQ ID NO: 31); y
Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 32).

El extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o variante del mismo se puede conjugar independientemente a una prolongación de aminoácido que contiene 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 o 40 aminoácidos. En una realización, la prolongación del aminoácido se obtiene a partir de NPPC, CNP53, ANP o BNP. En una realización específica, la prolongación del aminoácido es Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 33). En una realización relacionada, esta prolongación de 15 aminoácidos se añade al extremo N-terminal para proporcionar una variante de CNP de fórmula Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(b)₄-Gly₅-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-(h)₁₀-Leu_n-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 34).

En el presente documento se enseñan variantes de CNP que comprenden wtCNP22 o una variante del mismo (por ejemplo, una que tenga adición(s), deleción (s), y/o sustitución (s) tal como, por ejemplo, una sustitución de K4R) (SEQ ID NO: 35) conjugada en el extremo N-terminal y/o C-terminal con un polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG) para aumentar su tamaño molecular total hasta un intervalo de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 4, 5, 6 o 7 kDa. Tales variantes de CNP opcionalmente se conjugan adicionalmente en el extremo N-terminal y/o C-terminal con un grupo polimérico que comprende, por ejemplo, aminoácidos, carbohidratos, ácidos hidrófobos y/o fosfolípidos, siendo un ejemplo no limitante de las mismas una prolongación de aminoácido N-terminal que contiene de 1 a 35, o de 5 a 31, aminoácidos. En una realización, se añade un resto de polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG) de al menos aproximadamente 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6 o 1,8 kDa, o hasta aproximadamente 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 o 5 kDa, al extremo N-terminal y/o C-terminal de wtCNP22 o una variante del mismo.

Como se muestra en el presente documento, la conjugación de un polímero de PEG (o PEO) hidrófilo o soluble en agua de aproximadamente 0,6 kDa o más a CNP22 o variantes del mismo por lo general aumenta la resistencia a la decisión de NEP de forma notable. Sin embargo, la adición de PEG, incluso tan pequeño como de 0,6 kDa, a wtCNP22 puede reducir la funcionalidad de CNP (por ejemplo, la estimulación de la señalización de cGMP), y la adición de más de aproximadamente 2 o 3 kDa de PEG a CNP22 o variantes del mismo puede reducir la actividad funcional de CNP de una manera dependiente del tamaño. Pero la funcionalidad de CNP (al menos comparable con la de wtCNP22) se retiene cuando un polímero de PEG (o PEO) de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 1,2 kDa, o potencialmente de aproximadamente 2 kDa, se conjuga con una variante de CNP que tiene una prolongación de aminoácido N-terminal en la que al menos un aminoácido relativamente grande que puede estar potencialmente cargado con carga positiva en condiciones fisiológicas (por ejemplo, arginina) precede inmediatamente en la posición que corresponde a la Gly1 de CNP22, tal como, por ejemplo, GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38), ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39), R-CNP22 (SEQ ID NO: 40) y R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41).

Por consiguiente, en el presente documento se enseñan variantes de CNP PEGilado que comprenden, en el extremo N-terminal de CNP22 o una variante del mismo (por ejemplo, una que tenga una sustitución de K4R), una prolongación de aminoácido que contiene al menos 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, en la que el polímero de PEG está conjugado con el extremo N-terminal de la variante de CNP ampliada con aminoácido para dar como resultado una masa total caracterizada por los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa para un aumento de la resistencia a la escisión con NEP. Para un aumento de la funcionalidad de CNP, tales variantes de CNP prolongadas con aminoácido, pegiladas pueden contener al menos un aminoácido natural o natural relativamente grande que potencialmente puede estar cargado con carga positiva en condiciones fisiológicas, que precede inmediatamente a la posición que corresponde a Gly1 de CNP22. En una realización específica, las variantes de CNP prolongadas con aminoácido, pegiladas contienen al menos un resto de arginina que precede inmediatamente a la posición que corresponde a la Gly1 de CNP22.

Además de las variantes de CNP conjugadas en el extremo N-terminal y/o C-terminal con un polímero hidrófilo o soluble en agua tal como, por ejemplo, PEG (o PEO), en el presente documento se enseñan variantes de CNP conjugadas a un polímero de este tipo en un sitio interno. Para fines de brevedad, en el presente documento se usará PEG (o PEO) como un ejemplo representativo de un polímero hidrófilo o soluble en agua. Son posibles diversos sitios de PEGilación de una variante de CNP, que incluyen, pero no se limitan a: (1) PEGilación solamente en el extremo N-terminal; (2) PEGilación solamente en el extremo C-terminal; (3) PEGilación solamente en un sitio interno (por ejemplo, Lys4); (4) PEGilación tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal; (5) PEGilación en el extremo N-terminal y un sitio interno; y (6) PEGilación en el extremo C-terminal y un sitio interno. Para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP y retención de la funcionalidad de CNP, en ciertas realizaciones la masa total de variantes de CNP PEGilado se caracteriza por los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 4, 5, 6 o 7 kDa. En una realización en particular, CNP17, CNP22, CNP37 (definidos a continuación) o variantes de los mismos (incluyendo las que tienen adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácido) están PEGiladas solamente en el extremo N-terminal. En otra realización, las variantes de CNP están PEGiladas solamente en un sitio interno (por ejemplo, Lys4). En otra realización más, las variantes de CNP están PEGiladas en el extremo N-terminal y un sitio interno (por ejemplo, Lys4). Además, en otra realización, para mejor funcionalidad, las variantes de CNP no están PEGiladas en un sitio (por ejemplo, Lys10) dentro del dominio cíclico (que corresponde de Cys6 a Cys22 de CNP22). Para evitar la PEGilación en un sitio interno, Lys4 y/o Lys10 pueden

estar sustituidos con un aminoácido o peptidomimético natural o natural que no contenga un grupo amino primario reactivo en una cadena lateral, tal como, por ejemplo, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu o citrulina (Cit). En una realización en particular, Lys4 y/o Lys10 están sustituidos con Arg. En otra realización, Lys10 no está sustituido con Arg.

5 La divulgación contempla el uso de polímeros hidrófilos o solubles en agua (por ejemplo, moléculas de PEG) que pueden variar en el tipo (por ejemplo, homopolímero o copolímero; copolímero aleatorio, alternante o de bloque; línea no ramificado; monodisperso o polidisperso), unión (por ejemplo, unión hidrolizable o establezcan como, por ejemplo, enlace de amida, imina, aminal, alquileo, o éster), sitio de conjugación (por ejemplo, en el extremo N-terminal y/o C-terminal, preferentemente en cualquiera de los restos de la región ciclada de CNP (que corresponde a los restos 6-22 de CNP22)), y longitud (por ejemplo, de aproximadamente 0,2, 0,4 o 0,6 kDa a aproximadamente 2, 3, 4 o 5 kDa). El polímero hidrófilo o soluble en agua se puede conjugar con el péptido CNP por medio de química basada en N-hidroxisuccinimida (NHS) o basada en aldehído u otra química, tal como se conoce en la técnica. Tales variantes de CNP se pueden generar usando, por ejemplo, wtCNP-22 (2,2 kDa), CNP-17 que retiene solamente la región ciclada (restos 6-22) de wtCNP22, variantes de CNP que tengan una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22, o variantes con sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácido, por ejemplo, GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), R-CNP22 (SEQ ID NO: 40), R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38) y ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39). En una realización, las variantes de PEG-CNP que tienen una masa total caracterizada por los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, contienen un grupo PEG (o PEO) lineal, monodisperso conjugado en el extremo N-terminal y/o C-terminal a través de química basada en NHS o aldehído, o un grupo PEG ramificado con dos ramas o tres ramas conjugado en el extremo N-terminal y/o C-terminal a través de química basada en NHS. La divulgación contempla adicionalmente variantes de PEG-CNP cargadas con carga negativa diseñadas para una reducción de la eliminación renal, que incluyen, pero no se limitan a, compuestos carboxilados, sulfatados y fosforilados.

La divulgación contempla conjugados de PEG-CNP que comprenden PEG basado en NHS o aldehído de fórmula $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, en la que n es un número entero de 12 a 50, y el polímero de PEG tiene un peso molecular de hasta aproximadamente 2,5 kDa. En una realización específica, n es 12 o 24. En una realización, el grupo hidroxilo terminal del polímero de PEG está protegido con un grupo no reactivo. En una realización particular, el grupo protector es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo inferior tal como metilo.

Los polímeros de PEG o derivados de los mismos pueden tener un peso molecular medio en número en el intervalo de aproximadamente 0,4 kDa a aproximadamente 2,5 kDa o de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 1,5 kDa.

El péptido wtCNP o variante de CNP se puede conjugar con un resto que incluye, por ejemplo, bisfosfonatos, carbohidratos, ácidos hidrófobos (incluyendo ácidos grasos) o secuencias de aminoácidos. Tales secuencias de aminoácidos incluyen por ejemplo poliAsp o poliGlu útiles en la dirección a hueso/cartílago, o se pueden obtener a partir de proteínas óseas con dominios de dirección a hueso elucidados o derivados de los mismos, tales como por ejemplo las proteínas de fusión o secuencias de péptidos de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc. En las realizaciones que se describen en el presente documento en las que CNP22 o una variante del mismo se une a un resto de dirección a hueso o cartílago, tal resto se diseña para estimular la obtención del péptido CNP modificado a condrocitos de placas de crecimiento óseo, en las que el péptido se puede unir y activar NPR-B en los condrocitos.

La divulgación proporciona variantes de CNP con un enlace peptídico que es menos susceptible a la escisión por peptidasas incluyendo NEP. La divulgación incluye una variante de CNP que comprende al menos un resto modificado en un sitio de escisión con endopeptidasa. En una realización, el enlace peptídico de Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) en un sitio de escisión con NEP en CNP se puede sustituir con uno cualquiera de los siguientes isoésteres de enlace peptídico:

- CH₂-NH-,
- C(=O)-N(R)-, en el que el grupo amida está alquilado con cualquiera de los siguientes grupos R: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo,
- C(=O)-NH-CH₂-,
- CH₂-S-,
- CH₂-S(O)_n-, en el que n es 1 o 2,
- CH₂-CH₂-,
- CH=CH-,
- C(=O)-CH₂-,
- CH(CN)-NH-,
- CH(OH)-CH₂-,
- O-C(=O)-NH-, y
- NHC(=O)NH-.

En otra realización, Phe7 está sustituido con su enantiómero D-Phe. En otra realización más, se introducen enantiómeros D a uno o más, hasta todas, 22 posiciones dentro de wtCNP-22. En una realización más, un beta aminoácido tal como ácido 3-amino-2-fenilpropiónico está sustituido por Phe7, que aumenta la longitud la estructura principal a la vez que reduce la longitud de la cadena lateral. En otra realización más, la divulgación contempla análogos de Cys en la posición Cys6 que incluyen, pero no se limitan a, homocisteína, penicilamina, ácido 2-mercaptopropiónico, y ácido 3-mercaptopropiónico.

Incluso en presencia de un enlace resistente a NEP entre Cys6 y Phe7, otros enlaces específicos se pueden hidrolizar por NEP, incluyendo Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17 y Gly19-Leu20. Por consiguiente, la divulgación incluye análogos de CNP que contienen isoésteres de enlace peptídico en múltiples posiciones en la estructura principal de los análogos de CNP. En una realización, los análogos o variantes de CNP comprenden modificaciones en más de un sitio de escisión con peptidasa. En una realización más, la variante comprende un CNP con sustituciones en restos de aminoácidos importantes en la unión al sitio activo de NEP, aumentando de ese modo la resistencia a la degradación con NEP. Uno o más restos de unión a NEP, que incluyen, pero no se limitan a, Gly8, Gly15, Ser18, Gly19 y/o Gly21, están sustituidos con restos de aminoácidos naturales o naturales de tamaño más grande para reducir la afinidad con respecto al sitio de unión a NEP. En otra realización más, uno o más restos hidrófobos esenciales en el reconocimiento de NEP, que incluyen, pero no se limitan a, Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 y Leu20, están sustituidos con aminoácidos y/o peptidomiméticos naturales o no naturales que disminuyen la unión a NEP. En otra realización más, se puede hacer delección o sustitución de uno a cinco de los primeros cinco aminoácidos de CNP con cualquier otro aminoácido natural o aminoácidos o peptidomiméticos no naturales, o se pueden añadir uno o más aminoácidos o peptidomiméticos naturales o no naturales a una cualquiera o a todas las cinco primeras posiciones de CNP.

Las variantes de CNP pueden tener una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa para aumentar la resistencia a NEP, y se representan con la fórmula:

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(a)₄-Gly₅-(b)₆-(c)₇-(d)₈-(e)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-(i)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(j)₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 46), en la que:

(x) puede estar ausente o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso o cartílago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de proteínas óseas con dominios de dirección a hueso elucidados, tales como, por ejemplo, proteínas de fusión o secuencias peptídicas de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc.; moléculas poliméricas o no poliméricas que reducen la eliminación renal tales como, por ejemplo, moléculas de PEG cargadas; y prolongaciones que comprenden, por ejemplo, polímeros (por ejemplo, los PEG), carbohidratos, ácidos hidrófobos (incluyendo ácidos grasos), y/o aminoácidos, y en las que tales prolongaciones de aminoácido pueden contener, por ejemplo, de 1 a 31, o 1 a 35, o de 5 a 35, o de 10 a 35, o de 15 a 35 restos de aminoácidos, y se pueden obtener a partir de NPPC, ANP, BNP, otros (poli) péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, albúmina de suero o IgG, o variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente que tienen sustituciones, adiciones y/o delecciones, o combinaciones de los mismos;

(z) puede estar ausente o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso o cartílago tales como por ejemplo poliAsp y poliGlu, secuencias de aminoácidos de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas tales como, por ejemplo, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína, y que secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de (poli) péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína, y secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de (poli) péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, ANP o BNP;

(a) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (a) es Arg;

(b) se selecciona entre el grupo que consiste en Cys e isoésteres de enlace peptídico entre Cys6 y Phe7 tales como, por ejemplo, Cys-CH₂-NH;

(c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; derivados N-alquilados de Phe, en los que el grupo N-alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterociclilo, arilo C₆₋₁₄ y heteroarilo (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en la que el anillo de benceno del análogo de Phe puede

estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

(d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butil-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val y Asn;

(e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(f) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (f) no es Arg;

(g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, tBu-Gly, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

(i) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

(j) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

Las variantes de CNP pueden comprender una modificación en una o más de las posiciones 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 y/o 20, y pueden tener opcionalmente modificaciones en cualquiera de las otras posiciones desveladas en el presente documento.

En realizaciones que se describen en el presente documento en las que CNP22 o variantes del mismo se pueden unir a un ácido hidrófobo, los péptidos CNP se pueden unir a uno o más ácidos hidrófobos. Los ejemplos no limitantes de ácidos hidrófobos incluyen ácidos carboxílicos C₅-C₁₂ saturados o insaturados, de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, ácido pentanoico, ácido heptanoico, etc.) y ácidos grasos naturales. Los ácidos hidrófobos se pueden unir al extremo N-terminal, el extremo C-terminal, y/o la cadena lateral de uno o más restos de aminoácidos. En una realización, los ácidos hidrófobos se conjugan con el extremo N-terminal. En una realización, la conjugación de CNP22 o una variante del mismo a un ácido hidrófobo se diseñan, entre otros, para estimular la interacción no específica entre el péptido CNP modificado y albúmina de suero, aumentando de ese modo el tamaño del péptido CNP y protegiéndolo de la escisión con proteasas tales como, por ejemplo, NEP. La interacción entre el péptido CNP conjugado con ácido hidrófobo y la albúmina se diseña para que no sea demasiado fuerte, de modo que el péptido CNP modificado se puede difundir a través de cartílago, llegar a condrocitos de placas de crecimiento óseo, y unirse y activar a NPR-B.

En una realización más, la divulgación proporciona variantes de CNP *que in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o un 150 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μ M), que comprenden al menos un aminoácido modificado en la posición (b)₆, (c)₇ y/o (d)₈, y se representan con la fórmula general:

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(a)₄-Gly₅-(b)₆-(c)₇-(d)₈-(c)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-(i)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(j)₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 47), en la que:

(x) puede estar ausente o puede ser una secuencia peptídica que contiene de uno a cinco aminoácidos que se obtiene a partir de un polipéptido natriurético (por ejemplo, NPPC, CNP, ANP o BNP) o un polipéptido no natriurético como se describe en el presente documento (por ejemplo, HSA, IgG, una proteína de dirección a hueso, etc.);

(z) puede estar ausente o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso/cartílago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; proteínas óseas con dominios de dirección a hueso y derivados de las mismas, tales como proteínas de fusión o secuencias peptídicas de osteopontina, osteocalcina y sialoproteína; moléculas que reducen la eliminación renal, tales como, por ejemplo, PEG cargados; y moléculas que aumentan la resistencia de CNP a la degradación mediada con NEP, como se describe en el presente documento;

(a) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-

norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (a) es Arg;

(b) puede ser Cys o descarboxi cisteína, o el enlace peptídico (b)₆-(c)₇ (-C(=O)-NH-) se puede sustituir con uno cualquiera de los siguientes isoésteres de enlace peptídico:

- 5
- CH₂-NH-,
 - C(=O)-N(R)-, en el que el grupo amida está alquilado con cualquiera de los siguientes grupos R: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo,
 - C(=O)-NH-CH₂-,
 - 10 -CH₂-S-,
 - CH₂-S(O)_n-, en el que n es 1 o 2,
 - CH₂-CH₂-,
 - CH=CH-,
 - 15 -C(=O)-CH₂-,
 - CH(CN)-NH-,
 - CH(OH)-CH₂-,
 - O-C(=O)-NH-, o
 - NHC(=O)NH-;

20 (c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; isoésteres de enlace peptídico de Phe tales como derivados N-alkilados de Phe en los que el grupo N-alkilo se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-

25 alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, heterociclilo y heteroarilo (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en los que el anillo de benceno del análogo de Phe puede estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

30

(d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butil-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr y Asn;

35 (e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(f) es cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tiene un grupo amino primario en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en el que en una realización (f) no es Arg;

40

(g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

45 (h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, tBu-Gly e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

(i) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

50 (j) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

En una realización más, la divulgación incluye variantes de CNP que *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o un 150 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μM), que tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP, y se representan con la fórmula general:

55

60 (x)-(y)-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-(h)₁₀-Leu₉-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 48), en la que:

(x) es un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es el polietilenglicol (PEG), y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos que contiene de 1 a 35 aminoácidos y que se obtiene a partir de NPPC o variantes del mismo con sustituciones y/o deleciones, ANP, BNP, u otros (poli)peptidos que

65

no son CNP tales como, por ejemplo, albúmina de suero, IgG, glicoproteínas ricas en histidina, fibronectina, fibrinógeno, polipéptidos que contienen dedos de cinc, osteocrina o FGF2;

(y) puede estar ausente o puede ser uno o más aminoácidos de Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅ (que corresponden a las posiciones 1 a 5 de CNP22) (SEQ ID NO: 1) y/o sustituciones en una o más de esas posiciones usando aminoácidos naturales o no naturales (por ejemplo, sustitución de K4R);

(h) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (h) no es Arg; y

(z) puede estar ausente o puede ser un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es PEG, y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un polipéptido natriurético (por ejemplo, NPPC, CNP, ANP o BNP) o polipéptido no natriurético (por ejemplo, albúmina de suero o IgG).

En una realización, (x), (y) y (z) en conjunto contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 aminoácidos. En otra realización, (x) es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a 40 aminoácidos, o de 1 a 20 aminoácidos.

Además se contemplan are variantes de CNP que *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o un 150 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 uM), y comprenden la secuencia:

(y)-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-Lys₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂ (SEQ ID NO: 138), en la que:

(y) comprende uno o más aminoácidos seleccionados entre Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅ (SEQ ID NO: 1) y/o sustituciones en una o más de esas posiciones usando aminoácidos naturales o no naturales (por ejemplo, sustitución de K4R), y comprende adicionalmente un polímero hidrófilo o soluble en agua con un peso molecular de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 5 kDa. En una realización, el polímero hidrófilo o soluble en agua se conjuga con el extremo N-terminal de tal variante de CNP prolongada con aminoácido. En una realización particular, el polímero hidrófilo o soluble en agua es PEG (o PEO).

En otra realización más, la divulgación proporciona variantes de CNP que *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o un 150 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 uM), en la que las variantes de CNP comprenden una prolongación de péptido N-terminal y/o C-terminal que contiene de 1 a 15 aminoácidos, y se conjugan con un polímero hidrófilo o soluble en agua. En una realización, la prolongación de péptido contiene de 5 a 10 aminoácidos. En una realización específica, la prolongación de péptido contiene 5 aminoácidos. En otra realización específica, el polímero hidrófilo o soluble en agua es PEG (o PEO).

Además, en una realización adicional, las variantes de CNP de la divulgación *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o un 150 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 uM), y comprenden un fragmento de al menos a 15 aminoácidos obtenidos obtenida a partir del precursor de péptido natriurético C (NPPC), en el que el fragmento es homólogo en al menos un 70 % con una secuencia del d NPPC e tipo silvestre que contiene el mismo número de restos de aminoácidos.

Además, en otra realización, las variantes de CNP de la divulgación tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa para aumentar la resistencia a NEP, y se representan con la fórmula:

(x)-(b)₆-(c)₇-(d)₈-(e)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-(i)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(j)₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 49), en la que:

(x) puede estar ausente (es decir, los extremos N-terminales con un grupo -NH₂) o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una secuencia de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos del péptido Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅ (SEQ ID NO: 1); secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso/cartílago tales como por ejemplo poliAsp o poliGlu; dominios de dirección o hueso de proteínas óseas tales como por ejemplo osteopontina, osteocalcina o sialoproteína; moléculas que reducen la eliminación renal tales como polímeros hidrófilos o solubles en agua, que incluyen, pero no se limitan a, moléculas de PEG cargadas; y restos de comprenden PEG, carbohidratos, ácidos hidrófobos, aminoácidos, o combinaciones de los mismos, en las que tales restos pueden ser prolongaciones de aminoácido que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de NPPC o (poli)péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, BNP, ANP, albúmina

de suero o IgG;

5 (z) puede estar ausente o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso/cartílago tales como por ejemplo poliAsp o poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de proteínas de dirección a hueso, tales como por ejemplo osteopontina, osteocalcina o sialoproteína; y secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de NPPC o (poli) péptidos que no son CNP, como se describe en el presente documento;

10 (b) se selecciona entre el grupo que consiste en Cys e isoésteres de enlace peptídico entre Cys6 y Phe7 tales como, por ejemplo, Cys-CH₂-NH;

15 (c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; derivados N-alquilados de Phe, en los que el grupo N-alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, heterociclilo y heteroarilo (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en los que el anillo de benceno del análogo de Phe puede estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

20 (d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butyl-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr y Asn;

25 (e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

30 (f) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (f) no es Arg;

35 (g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, tBu-Gly e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

40 (i) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

(j) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

45 Las variantes de CNP de la presente divulgación tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa para aumentar la resistencia a NEP, y se representan con la fórmula:

50 (x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(a)₄-Gly₅-(b)₆(c)₇-(d)₈-(e)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-(i)₁₅-Ser₁₆-(j)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(k)₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 50), en la que:

55 (x) y (z) independientemente pueden estar ausentes o se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso/cartílago tales como por ejemplo poliAsp o poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas y derivados de los mismos, tales como por ejemplo proteínas de fusión o secuencias peptídicas de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc.; restos que reducen la eliminación renal, que incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrófilos o solubles en agua tales como, por ejemplo, moléculas de PEG cargadas; y restos que comprenden, por ejemplo, polímeros hidrófilos (por ejemplo, PEG), carbohidratos, ácidos hidrófobos, y/o aminoácidos;

60 (a) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (a) es Arg;

65 (b) se selecciona entre el grupo que consiste en Cys e isoésteres de enlace peptídico entre Cys6 y Phe7 tales

como, por ejemplo, Cys-CH₂-NH;

(c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; derivados N-alquilados de Phe, en los que el grupo N-alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, heterociclilo y heteroarilo (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en los que el anillo de benceno del análogo de Phe puede estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

(d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butil-Gly, Thr, Ser, Val y Asn;

(e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(f) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (f) no es Arg;

(g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Asn, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, terc-butil-Gly (tBu-Gly), Asn, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

(i) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, Arg, Ser y Asn;

(j) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

(k) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butil-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

Las variantes de CNP pueden tener sustitución o sustituciones de aminoácidos en una o más de cualquiera de las posiciones 1 a 22 de CNP22. En una realización, Gly1 está sustituido con Arg o Glu. En otra realización, Lys4 está sustituido con Arg. Además, en otra realización, Gly5 está sustituido con Arg, Gln o Ser. En otra realización más, Gly15 está sustituido con Ser, Asn, Arg o Cit. En una realización más, Gly19 está sustituido con Ser, Arg o Asn. En otra realización más, Gly21 está sustituido con Ser, Thr, o Arg.

Una variante de CNP se puede seleccionar entre el grupo que consiste en GLSKGC(CH₂NH)FGLKLDRIKMSGLGC (formado usando descarboxi-Cys) (SEQ ID NO: 56), GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 57), GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 136), GLSKGCF-(tBuG)-LKLDRIGMSGLGC (SEQ ID NO: 58), GLSKGC-(3-CI-Phe)-GLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 137), y GLSKGC-[NHCH₂CH(Ph)CO]-GLKLDRIKMSGLGC (formado usando ácido 3-amino-2-fenilpropiónico) (SEQ ID NO: 59). En una realización más, existe un enlace disulfuro entre Cys6, descarboxi-Cys u otro análogo de cisteína que contiene sulfhidrilo en la posición de Cys6, y Cys22 de cualquier variante de CNP descrita en el presente documento.

Una variante de CNP puede contener una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o CNP 17, que incluye, pero no se limita a:

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANCKGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (CNP-53) (SEQ ID NO: 4);
 QEHPNARKYICGANCKGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (CNP-37, Análogo BL) (SEQ ID NO: 60);
 AAWARLLQEHPNAGLSKGCFLKLDRIKMSGLGC (Análogo CA) (SEQ ID NO: 61);
 AAWARLLQEHPNARGLSKGCFLKLDRIKMSGLGC (Análogo CB) (SEQ ID NO: 62);
 DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLICLDRIKMSGLGC (Análogo CC) (SEQ ID NO: 63);
 RGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 40);
 ERGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 38);
 GANQQGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 64);
 GANRRGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 65);
 GANPRGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 66);
 GANSSGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 67);
 GHKSEVAHRFKGANCKGLSKGCFGLKLDRIKMSGLGC (SEQ ID NO: 144) (en ocasiones denominado

"CNP27-HSA" o "HSA-CNP27" en los Ejemplos y figuras);
 SPKMQVQSG-CNP17-KVLRH (Análogo CD) (SEQ ID NO: 68) (CNP17 que tiene colas N-terminales y C-terminales obtenidas a partir de BNP).

5 Una variante de CNP puede tener una sustitución de K4R en la posición 4 de CNP22. Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP(K4R) incluyen:

10 GANRRGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo AY) ((SEQ ID NO: 36);
 GANPRGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CI) (SEQ ID NO: 37);
 RGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo AZ) (SEQ ID NO: 41);
 ERGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo BA) (SEQ ID NO: 39);
 GANQQGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CH) (SEQ ID NO: 69); y
 GANSSGLSRGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CG) (SEQ ID NO: 70).

15 Las variantes de CNP pueden tener un resto de PEG (o PEO) y una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal que contiene arginina en la posición que precede inmediatamente a la posición que corresponde a Gly1 de CNP22. Tales variantes de CNP PEGilado se diseñan para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP, reducción de la unión a albúmina de suero, y aumento de la actividad funcional de CNP (por ejemplo, activación de la señalización de cGMP). Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP PEGilado incluyen PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), PEO24-GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 65), PEO12-GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 65), PEO24-GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), PEO12-GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), PEO24-GANPR-CNP22 (SEQ ID NO: 37), PEO12-GANPR-CNP22 (SEQ ID NO: 66), PEO24-GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64), PEO12-GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64), PEO24-ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39), PEO12-ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39), PEO24-ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38), PEO12-ER-CNP22(SEQ ID NO: 38), PEO24-R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), PEO12-R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), PEO24-R-CNP22 (SEQ ID NO: 40), y PEO12-R-CNP22 (SEQ ID NO: 40), en las que PEO24 es un polímero de PEG de 1,2 kDa monodisperso y PEO12 es un polímero de PEG de 0,6 kDa monodisperso. En una realización, el polímero de PEG (o PEO) está unido al extremo N-terminal de las variantes de CNP.

30 Las variantes de CNP adicionales descritas son derivados de CNP37 que tienen mutación o mutaciones en el sitio de escisión de furina (subrayado), diseñados para aumentar la resistencia *in vivo* a la proteasa de furina, y/o que tienen glicina (subrayado) precediendo a glutamina, diseñados para evitar la formación de piroglutamina, que incluyen, pero no se limitan a:

35 GQEHPNARKYKGANPKLSKGCFLKLDRISSMSGLGC (An. CS) (SEQ ID NO: 71);
GQEHPNARKYKGANQKLSKGCFLKLDRISSMSGEGC (An. CT) (SEQ ID NO: 72);
GQEHPNARKYKGANQGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (An. CU) (SEQ ID NO: 73);
GQEHPNARKYKGANPGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (An. CW) (SEQ ID NO: 74);
GQEHPNARKYKGANKKLSKGCFLKLDRISSMSGLGC (Gly-CNP37, An. DB) (SEQ ID NO: 75);
 40 PGQEHPNARKYKGANKKLSKGCFLKLDRISSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145).

Las variantes de CNP pueden ser quimeras que comprenden CNP22 y un fragmento de péptido N-terminal, que incluyen, pero no se limitan a:

45 GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLORIGSSMSGLGC (Análogo CQ) (quimera de fragmento de glicoproteína rica en histidina (HRGP)-CNP22) (SEQ ID NO: 76);
 GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CR) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID NO: 77);
 50 GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CX) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID NO: 78);
 GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CF) (quimera de fragmento de IgG1(Fc) CNP22) (SEQ ID NO: 79);
 GQHKKDDNPPLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CY) (quimera de fragmento de albúmina de suero humano (HSA)-CNP22) (SEQ ID NO: 80);
 55 GERAFKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CE) (quimera de fragmento de HSA-CNP22) (SEQ ID NO: 81);
 FGIPMDRIGRNPRLSKGCFGLKLDRISSMSGLGC (Análogo CZ) (quimera de fragmento de "inhibidor de NPR C" de osteocrina-CNP22) (SEQ ID NO: 82); y
 GKRTGQYKLSKGTGPGPKLSKGCFLKLDRISSMSGLGC (Análogo DA) (quimera de fragmento de "dominio de unión a heparina" de FGF2-CNP22) (SEQ ID NO: 83).
 60

Las variantes de CNP que se describen adicionalmente son quimeras que comprenden un fragmento de péptido N-terminal y CNP22 en las que la arginina está sustituida por la Lys4 de CNP22 ("CNP22(K4R)"), que incluyen, pero no se limitan a:

65

GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CK) (quimera de fragmento de IgG1(Fc)-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 84);
 GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CL) (quimera de fragmento de HSA-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 85)
 5 GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CM) (quimera de fragmento de fibronectina-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 86);
 GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CO) (quimera de fragmento de fibrinógeno-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 88); y
 10 GSSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CP) (quimera de fragmento de dedos de cinc-CNP22) (SEQ ID NO: 89).

Las variantes de CNP pueden ser quimeras, o proteínas de fusión, que comprenden un péptido o variante de CNP, y un péptido o proteína escindible, o etiqueta peptídica. Las proteínas ofrecidas que se pueden escindir a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de histidina (por ejemplo, hexa-His); TAF12: factor de transcripción humano TAF12; KSI: cetosteroido isomerasa; MBP: proteína de unión a maltosa; β -Gal: β -galactosidasa; GST: glutatión-S-transferasa; Trx: tioredoxina; CBD: dominio de unión quitina; BMPM: mutación BMP-2, SUMO, CAT, TrpE, proteína A estafilocócica, proteínas estreptocócicas, proteína de unión a almidón, dominio de endoglucanasa A de unión a celulosa, dominio de endoglucanasa Cex de unión a celulosa, dominio de unión a biotina, recA, Flag, c-Myc, poli(His), poli(Arg), poli(Asp), poli(Gln), poli(Phe), poli(Cys), proteína fluorescente de color verde, proteína fluorescente de color rojo, proteína fluorescente de color amarillo, proteína fluorescente de color cian, biotina, avidina, estreptavidina, epítopos de anticuerpo, y fragmentos de los mismos.

Una variante de CNP puede ser un monómero o un dímero. En una realización relacionada los monómeros de variantes de CNP dímérico pueden unir el extremo N-terminal al extremo N-terminal a través de un conector o no conector, el extremo N-terminal al extremo C-terminal a través de un conector o no conector, o el extremo C-terminal al extremo C-terminal a través de un conector o no conector.

Las quimeras que comprenden un fragmento de IgG y CNP22 o una variante de los mismos se diseñan para, entre otros, aumentar la resistencia a la degradación de NEP y reducir la unión a albúmina de suero. Las quimeras de CNP que comprenden un fragmento de superficie de HSA se diseñan para, entre otros, reducir la inmunogenicidad y reducir la unión a albúmina de suero. Las quimeras de HRGP-CNP22 y HRGP-CNP22(K4R) que contienen una secuencia que no es arginina, que no es lisina, ricas en histidina, catiónicas c en el extremo N-terminal se diseñan para, entre otros, aumentar la estabilidad a las proteasas. Las quimeras que contienen un fragmento de osteocrina se diseñan para liberar, después de escisión con proteasa (por ejemplo, furina), el fragmento de osteocrina en las placas de crecimiento óseo, en las que el fragmento podría inhibir la eliminación del receptor NPR-C. Con respecto a las quimeras que comprenden un fragmento de unión a heparina de FGF2, la unión de la heparina al fragmento se diseña para proteger la quimera de la degradación, proporcionando de ese modo una semivida en suero más larga. Las quimeras que contienen un fragmento de fibronectina, fibrinógeno, o dedos de cinc se diseñan para reducir la unión a albúmina de suero, entre otras características ventajosas.

Sin pretender quedar ligado por la teoría, una variante de CNP de un peso molecular de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa que tiene un aumento de la resistencia a la degradación de NEP y tiene funcionalidad similar o aumentada (por ejemplo, unión a NPR-B y estimulación de la señalización de cGMP) tal como en comparación con wtCNP22, puede ser más eficaz si no se une estrechamente a proteínas plasmáticas tales como albúmina de suero. Una variante de CNP que no se une estrechamente a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina de suero) debe ser más eficaz para difundirse a través del cartílago, alcanzando los condrocitos de placas de crecimiento óseo, y uniéndose a y activando a NPR-B para la señalización de cGMP. Las variantes de CNP diseñadas para reducción de la unión a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina de suero) son quimeras que comprenden CNP22 o una variante del mismo y un fragmento peptídico de IgG. Las variantes de CNP diseñadas para reducción de la unión a proteínas plasmáticas son quimeras que comprenden CNP22 o CNP22(K4R) y un fragmento de un polipéptido (por ejemplo, IgG, HSA, fibronectina, fibrinógeno, un polipéptido que contiene dedos de cinc, etc.). Otras variantes de CNP diseñadas para reducción de la unión a proteínas plasmáticas comprenden CNP22 o una variante del mismo conjugada a un polímero hidrófilo o soluble en agua. En una realización, el polímero hidrófilo o soluble en agua es PEG (o PEO). En otra realización, el polímero hidrófilo o soluble en agua (por ejemplo, PEG) está funcionalizado con uno o más grupos funcionales que transmiten una carga negativa al polímero en condiciones fisiológicas, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo, sulfato o fosfato, o una combinación de los mismos.

En cualquiera de las realizaciones que se desvelan en el presente documento, las variantes de CNP pueden tener una actividad biológica sustancialmente igual o mejor que el CNP22 de tipo silvestre. Por ejemplo, las variantes de CNP pueden retener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o mo más de la actividad del CNP22 de tipo silvestre, o pueden tener una actividad superior a la de CNP22, por ejemplo, con respecto a la interacción con NPR-B (GC-B) para estimular la generación de cGMP. Como alternativa, o además, las variantes de CNP pueden retener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la actividad del CNP22 de tipo silvestre, o pueden tener una actividad superior a la de CNP22, con respecto a la regulación del crecimiento óseo endocondral y la actividad de los condrocitos, que incluye, pero no se limita a, proliferación de condrocitos, diferenciación de condrocitos,

inhibición de la ruta de señalización de proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) / MEK (Raf-1) quinasa, y estimulación de la osificación endocondral. En cualquiera de las realizaciones que se describen en el presente documento, las variantes de CNP pueden comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga en al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más a los aminoácidos 6-22 o 1-22 del CNP22 de tipo silvestre.

La divulgación proporciona variantes de CNP22 que tienen menos afinidad con respecto al receptor de eliminación de NPR-C a la vez que retienen la capacidad para unirse y activar a NPR-B. La presente divulgación incluye variantes que se generaron, o se pueden generar, a partir de un modelo estructural basado en homología el complejo NPR-B/CNP como se describe en la Descripción Detallada. En otra realización, las variantes de CNP tienen sustitución o sustituciones en uno o más sitios de Gly en las posiciones 1, 5, 8, 15, 19 y 21, para reducir la flexibilidad conformacional, que puede aumentar su especificidad para la unión a NPR-B con respecto al NPR-C. Las variantes de CNP que tienen una afinidad potencialmente reducida con respecto al NPR-C incluyen, pero no se limitan a, las que tienen una o más de las siguientes sustituciones: G1R, G1E, G5R, G5Q, G5S, F7Y, G8T, G8S, G8V, G8N, L9S, L9T, K10Cit K10Q, K10S, I14N, G15R, G15S, G15N, G15Cit, S16Q, M17V, M17N, G19S, G19R, G19N, L20V, L20R, L20T, L20S, G21S, G21T y G21R.

Las variantes de CNP pueden tener una modificación y/o sustitución en una más de las posiciones 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 y 21, y opcionalmente pueden tener modificaciones y/o sustituciones en cualquiera de las otras posiciones que se desvelan en el presente documento. En una realización más, las variantes de CNP pueden tener opcionalmente conjugación(s) o prolongación (s), por ejemplo, en el extremo N- y/o C-terminal para facilitar la dirección a hueso/ cartílago, reducir la eliminación renal, y/o aumentar la resistencia a la degradación con NEP. Tal conjugación(s) o prolongación(s) puede comprender moléculas o secuencias formadas u obtenidas a partir de, por ejemplo, poliAsp, poliGlu, péptidos de dirección a hueso o cartílago, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, PEGs, carbohidratos, ácidos hidrófobos, NPPC o (poli)péptidos que no son CNP, o combinaciones de los mismos.

La presente invención proporciona un método para la producción recombinante de una variante de CNP de la presente invención como se enseñan las reivindicaciones.

Las variantes de CNP se pueden preparar mediante métodos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida con aminoácido(s) o peptidomimético(s) naturales o naturales que se sustituyen y/o se añaden cuando sea apropiado. En otra realización, las variantes de CNP se producen mediante procesos de síntesis recombinante, por ejemplo, a través de proteínas de fusión que contienen una proteína de etiqueta o vehículo, en las que el uso de la proteína de etiqueta o vehículo facilita, por ejemplo, la detección, aislamiento y/o purificación de la proteína de fusión, y la escisión química o proteolítica selectiva de la proteína de etiqueta o vehículo de la proteína de fusión proporciona la variante de CNP diana. En una realización más, la PEGilación de las variantes de CNP se produce después de, o parte de, síntesis química o biológica con la reacción de conjugación siendo realizada mediante química basada en NHS o aldehído u otra química conocida en la técnica. En otra realización, las variantes de CNP comprenden un enlace disulfuro. En una realización relacionada, el enlace disulfuro forma un péptido cíclico. En una realización particular, el enlace disulfuro se forma entre restos de cisteína en las posiciones que corresponden a las posiciones 6 y 22 de CNP22.

Las variantes de CNP se pueden conjugar a un resto polimérico o no polimérico hidrófobo tuvo, tal como, por ejemplo, ácido heptanoico, ácido pentanoico, o ácidos grasos. El resto hidrófobo se puede conjugar con la cadena lateral de un resto de aminoácido, que incluye, pero no se limita a, una lisina, una serina, una cisteína o una treonina, o se puede unir al extremo N-terminal y/o C-terminal de la variante de CNP.

En una realización, las variantes de CNP, como se describe en el presente documento, tienen un pI en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 10,5 o de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10.

En una realización más, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de CNP, opcionalmente otro agente biológicamente activo, y opcionalmente un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones son composiciones farmacéuticas estériles adecuadas para inyección parenteral. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una variante de CNP sustancialmente pura, por ejemplo pura en al menos aproximadamente un 90 % o un 95 %. En algunas realizaciones, las composiciones contienen menos de aproximadamente un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0,5 % de contaminantes, tales como otras proteínas humanas, proteínas de porcino, o CNP53 o fragmentos de los mismos (otros distintos de la variante de CNP deseada). En ciertas realizaciones, la composición estéril se administra a un sujeto para tratar o prevenir cualquiera de las afecciones o trastornos sensibles a CNP que se desvelan en el presente documento.

Las variantes de CNP de la divulgación de forma ventajosa retienen la actividad de CNP y presentan un aumento de la semivida en suero. La retención de la actividad de CNP se puede mostrar, por ejemplo, como retención del efecto biológico *in vivo* deseado, o retención de al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o al menos aproximadamente un 100 % de la actividad de estimulación de cGMP de CNP22, con la misma concentración (por ejemplo, 1 uM de Péptido CNP o superior a la DE80). En algunas realizaciones, las variantes de

CNP presentan un aumento de la semivida en suero en comparación con CNP22 de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces o 40 veces.

5 En una realización relacionada, las variantes de CNP que se describen en el presente documento tienen un aumento de la resistencia a NEP y presentan un aumento de la semivida en comparación con el CNP22 de tipo silvestre. En una realización, la semivida de las variantes de CNP aumenta en aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente un 100 % en comparación con el CNP22 de tipo silvestre.

10 En ciertas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento aumentan la producción de cGMP *in vitro*, aumentan la producción de cGMP *in vivo*, aumentan el nivel *in vivo* de uno o más biomarcadores asociados con la formación o crecimiento de cartílago o hueso, aumentan la resistencia a la escisión con NEP *in vitro*, aumentan la semivida en plasma o en suero *in vivo*, aumentan la biodisponibilidad *in vivo*, o aumentan la longitud de huesos en particular *in vivo*, o efectúan combinaciones de tales aumentos, en aproximadamente 1,5
15 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,5 veces, o aproximadamente 5 veces o más en comparación con el CNP22 de tipo silvestre.

20 En otra realización más, la divulgación proporciona una variante de CNP o composición farmacéutica que comprende a la misma para su uso en un método para tratar trastornos de crecimiento óseo, que incluyen, pero no se limitan a, displasias esqueléticas y malformaciones esqueléticas hereditarias tales como trastornos asociados con el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-3). En una realización específica, las mutaciones en el receptor asociadas con la mutación o mutaciones de FGFR-3 es la acondroplasia. En otra realización, los trastornos sensibles a CNP son trastornos asociados con células y tejidos del músculo liso vascular. En una realización más,
25 las variantes de CNP son útiles para aumentar el tamaño de la placa de crecimiento de un hueso (por ejemplo, un hueso de una extremidad). En otra realización, las variantes de CNP son útiles para alargar un hueso o aumentar el crecimiento de un hueso largo. Además, en otra realización, las variantes de CNP son útiles para aumentar la producción, proliferación y diferenciación de condrocitos de matriz.

30 En ciertas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se administran a una dosis en el intervalo de aproximadamente 5 o 10 nmol/kg a aproximadamente 300 nmol/kg, o de aproximadamente 20 nmol/kg a aproximadamente 200 nmol/kg. En algunas realizaciones, las variantes de CNP se administran a una dosis de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150,
35 175, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 nmol/kg u otra dosis que el médico que prescribe considere apropiada. En otras realizaciones, las variantes de CNP se administran a una dosis de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 o 800 ug/kg, o aproximadamente 1 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg u otra dosis que el médico que prescribe considere apropiada. Las dosis de las variantes de CNP que se describen en el presente documento se pueden administrar de acuerdo con la frecuencia de dosificación/frecuencia de administración que se describe en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, diariamente, 2 o 3 veces a la semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3
40 semanas, mensualmente, etc.

45 En otra realización, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se administran en un solo tratamiento o en múltiples dosis. Las múltiples dosis se pueden administrar diariamente, o en múltiples dosis durante el transcurso del tratamiento. En ciertas realizaciones, se contempla que la variante de CNP se administre, en una sola dosis o en múltiples dosis, diariamente, cada dos días, cada 3 días, 2 veces a la semana, 3 veces a la semana, semanalmente, quincenalmente, cada 3 semanas, mensualmente, cada 6 semanas, cada 2 meses, cada 3 meses o según lo considere apropiado el médico que prescribe.
50

En ciertas realizaciones, la administración de la variante de CNP se ajusta para permitir periodos de crecimiento (por ejemplo, condrogénesis), seguidos de un periodo de recuperación (por ejemplo, osteogénesis). Por ejemplo, la variante de CNP se puede administrar por vía subcutánea, por vía intravenosa, o mediante cualquier otra vía diariamente o múltiples veces a la semana durante un periodo de tiempo, seguido de un periodo de no tratamiento, a continuación el ciclo se repite. En algunas realizaciones, el periodo de tratamiento inicial (por ejemplo, la administración de la variante de CNP diariamente o múltiples veces a la semana) es de 3 días, 1 semana, 2
55 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas o 12 semanas. En una realización relacionada, el periodo de no tratamiento dura 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En ciertas realizaciones, el régimen de dosificación de la variante de CNP es diario durante 3 días seguido de 3 días de descanso; o diario o múltiples veces a la semana durante 1 semana seguido de 3 días o 1 semana de descanso; o diariamente o múltiples veces a la semana durante 2 semanas seguido de 1 o 2 semanas de descanso; o diariamente o múltiples veces a la semana durante 3 semanas seguido de 1, 2 o 3 semanas de descanso; o diariamente o múltiples veces a la semana durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12
60 semanas seguido de 1, 2, 3 o 4 semanas de descanso.

65

Además, se describe un método para tratar una afección o trastorno sensible a CNP, que comprende administrar un péptido o variante de CNP a un sujeto, y controlar el nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago en el sujeto (por ejemplo, en una muestra biológica del sujeto), en el que un aumento o disminución del nivel del biomarcador asociado a hueso o cartílago indica un efecto terapéutico del péptido o variante de CNP en el sujeto se enseña en el presente documento. En algunas realizaciones, cuando el nivel de un biomarcador aumenta en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago, un aumento en el nivel del biomarcador indica un efecto terapéutico del péptido o variante de CNP en el sujeto. En otras realizaciones, cuando el nivel de un biomarcador disminuye en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago, una disminución en el nivel de ese biomarcador indica un efecto terapéutico del péptido o variante de CNP en el sujeto.

En otras realizaciones, el uso en el método terapéutico que se describe en el presente documento comprende adicionalmente ajustar la cantidad (o dosis) o frecuencia de administración del péptido o variante de CNP, en el que:

- (i) la cantidad (o dosis) o frecuencia de administración del péptido o variante de CNP aumenta si el nivel de el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago es inferior a un nivel diana, en el que el nivel del biomarcador aumenta en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago; o
- (ii) la cantidad (o dosis) o frecuencia de administración del péptido o variante de CNP disminuye si el nivel de el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago es superior a un nivel diana, en el que el nivel del biomarcador aumenta en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago; o
- (iii) la cantidad (o dosis) o frecuencia de administración del péptido o variante de CNP aumenta si el nivel de el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago es superior a un nivel diana, en el que el nivel del biomarcador disminuye en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago; o
- (iv) la cantidad (o dosis) o frecuencia de administración del péptido o variante de CNP disminuye si el nivel de el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago es inferior a un nivel diana, en el que el nivel del biomarcador disminuye en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago.

Se contempla que el nivel diana de un biomarcador se refiere al nivel o intervalo de niveles del biomarcador que está asociado con efecto terapéutico en el sujeto y/o efecto beneficioso para aliviar o mejorar los síntomas del trastorno o afección. En ciertas realizaciones, un nivel de un biomarcador por encima o por debajo de un nivel diana puede ser perjudicial para el sujeto.

En el presente documento también se enseña un método para evaluar el efecto de la administración de un péptido o variante de CNP en la formación o crecimiento de hueso o cartílago. En una realización, el método proporciona la evaluación o medición del nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago en un sujeto al que se le ha administrado péptido o variante de CNP para evaluar el efecto del péptido o variante de CNP en la formación y crecimiento de hueso y cartílago *in vivo*. En una realización relacionada, un aumento en el nivel de el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago puede indicar que la administración del péptido o variante de CNP tiene un efecto positivo en la formación o crecimiento de hueso o cartílago y es un tratamiento útil para displasias esqueléticas y otras enfermedades o trastornos relacionados con hueso o cartílago asociados con una disminución de la actividad de CNP. Los biomarcadores asociados a hueso o cartílago a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, CNP (por ejemplo, nivel endógeno de CNP-22 o CNP-53), cGMP, osteocalcina, antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), propéptidos de procolágeno de tipo I (PINP) y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo I y fragmentos de los mismos, propéptidos de colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, sulfato de agregano y condroitina, y fosfatasa alcalina.

En el presente documento también se enseña un método para evaluar el efecto del péptido o variante de CNP en el nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago en un sujeto, que comprende evaluar o medir el nivel del biomarcador asociado a hueso o cartílago en una muestra biológica de un sujeto al que se le ha administrado un péptido o variante de CNP. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la administración del péptido o variante de CNP al sujeto antes de evaluar o medir el nivel del biomarcador asociado a hueso o cartílago.

En ciertas realizaciones, el al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago se selecciona entre el grupo que consiste en CNP (por ejemplo, nivel endógeno de CNP-22 o CNP-53), cGMP, propéptidos de colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, osteocalcina, antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), propéptidos de procolágeno de tipo I (PINP) y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo I y fragmentos de los mismos, sulfato de agregano y condroitina, y fosfatasa alcalina.

En los métodos (por ejemplo, métodos terapéuticos, de diagnóstico y de ensayo) que se refieren a biomarcadores asociados a hueso o cartílago enseñados en el presente documento, el péptido o variante de CNP puede ser CNP-22, CNP-53, o cualquiera de los péptidos y variantes de CNP que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones de tales métodos, el péptido o variante de CNP no es CNP-22 o CNP-53.

En el presente documento se enseña un método para la producción recombinante de una variante de CNP, que comprende cultivar en un medio una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de variante de CNP unido a un polinucleótido que codifica un péptido o proteína escindible, en condiciones que dan como resultado la expresión de un polipéptido de fusión codificado por los polinucleótidos. En una realización

relacionada, la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido de variante de CNP unido a un polinucleótido que codifica un péptido o proteína escindible.

5 En una realización, el vector es un plásmido. Además, en otra realización, el plásmido se selecciona entre el grupo que consiste en pET-21 a, pJexpress, pET-31b, pET-15b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pQE-30, pET-SUMO, pET-22b, y pTYB11.

10 En ciertas realizaciones, el péptido o proteína escindible comprende un polipéptido que se selecciona entre el grupo que consiste en una etiqueta de histidina, factor de transcripción humano TAF12, cetosteroides isomerasa, proteína de unión a maltosa, β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, dominio de unión a quitina, y mutación de BMP-2, o fragmentos de los mismos.

15 En una realización relacionada, el péptido o proteína escindible se escinde con un agente de escisión. En algunas realizaciones, el agente de escisión se selecciona entre el grupo que consiste en ácido fórmico, bromuro de cianógeno (CNBr), hidroxilamina, autoescisión de proteína, Factor Xa, enteroquinasa, ProTEV, y proteasa de SUMO. Los agentes de escisión a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero no se limitan a, paladio, clostridolor, trombina, quimotripsina, tripsina, proteasas similares a tripsina, carboxipeptidasa, enteropeptidasa, proteasa de Kex 2, proteasa de Omp T, subtilisina, proteasa de V8, proteasa del VIH, proteasa de rinovirus, proteasa de furilisina, proteasas de IgA, proteasa de Pace humano, colagenasa, proteasa de Nia, proteasa de 2Apro de poliovirus, proteasa de 3C de poliovirus, genenasa, furina, elastasa, Proteinasa K, pepsina, renina (quimosina), proteasas aspárticas microbianas, padolor, caldolor, quimopadolor, ficina (ficaína), bromelaina (bromelasa), catespina B, caspasas, termolisina, Endoproteasa Arg-C, Endoproteasa Glu-C, Endoproteasa Lys-C, kalikreína, y plasmina.

25 En ciertas realizaciones, el polipéptido de fusión se expresa como una proteína soluble o como un cuerpo de inclusión. En una realización relacionada, la divulgación contempla aislar el polipéptido de fusión expresado de la célula hospedadora o medio de cultivo. En una realización más, el polipéptido de fusión aislado se pone en contacto con un agente de escisión como se describe en el presente documento.

30 En una realización, la divulgación proporciona una célula hospedadora bacteriana que comprende un vector de expresión, y dicho vector comprende un polinucleótido que codifica una variante de péptido CNP unido a un polinucleótido que codifica un péptido o proteína escindible. En algunas realizaciones, el péptido o proteína escindible se selecciona entre el grupo que consiste en una etiqueta de histidina, factor TAF 12 de transcripción humano, cetosteroides isomerasa, proteína de unión a maltosa, β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, dominio de unión a quitina, y BMP-2.

35 En otra realización, la célula hospedadora es una bacteria, tal como *E. coli*. En una realización relacionada, la célula de *E. coli* se selecciona entre el grupo que consiste en BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [también denominada C41(DE3)], C43 [también denominada C43(DE3)], Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX, y Tuner(DE3). Además, en una realización adicional, la célula hospedadora comprende un vector como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la célula hospedadora se transforma con el vector antes del cultivo celular.

45 En ciertas realizaciones, se contempla que la célula hospedadora se cultive en un medio en condiciones adecuadas para la expresión de un polipéptido de fusión codificado por los polinucleótidos. En una realización, el polipéptido de fusión se expresa como una proteína soluble o como cuerpo de inclusión. En una realización relacionada, el polipéptido de fusión expresado se aísla de la célula hospedadora o medio de cultivo. Además, en otra realización, el polipéptido de fusión aislado se pone en contacto con un agente de escisión como se describe en el presente documento.

50 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra expresión de proteínas de fusión a CNP en *E. coli* (Fig. 1A: tinción con azul de Coomassie, Fig 1B: transferencia de Western). M: marcador de proteína; T: lisados de células totales; S: sobrenadantes solubles; P: 2 ug de CNP22; KSI: expresión de proteína de fusión a KSI-CNP(M/N) (insoluble); N: lisados totales de proteína de fusión a KSI-CNP sin inducir; KSI': expresión de proteína de fusión a KSI-P-CNP (insoluble); Trx: expresión de proteína de fusión a Trx-P-CNP (soluble); MBP: expresión de proteína de fusión a MBP-P-CNP (soluble); TAF: expresión de proteína de fusión a TAF-P-CNP (insoluble) (BL21); TAF': expresión de proteína de fusión a TAF-P-CNP (insoluble) BL21(DE3), en la que CNP es Gly-CNP37.

60 La Figura 2 muestra la escisión con ácido fórmico de cuerpos de inclusión de TAF-CNP. M: marcador de proteína; 1: control positivo de Gly-CNP37; 2: cuerpos de inclusión de TAF-CNP sin escindir; 3: un 2 % de ácido fórmico de cuerpos de inclusión de TAF-CNP escindidos, en el que CNP es Gly-CNP37.

65 Las Figuras 3A-E representan la expresión de proteínas de fusión a CNP en *E. coli*. M: marcador de proteína; Tu: lisados celulares sin inducir totales; Su: sobrenadantes solubles sin inducir; T: lisados celulares inducidos totales; S: sobrenadantes solubles; C1: CNP22; C: Gly-wtCNP37 ("CNP38"); P: sedimentos insolubles. A: KSI: expresión

de proteína de fusión a KSI-CNP38(M/N) (Insoluble); KSI': expresión de proteína de fusión a KSI-Pro-CNP38 (Pro-Gly-wtCNP37 se denomina "Pro-CNP38") (Insoluble); Trx: expresión de fusión a Trx-Pro-CNP38 (Soluble); MBP: expresión de proteína de fusión a MBP-Pro-CNP38 (Soluble); TAF: expresión de proteína de fusión a TAF-Pro-CNP38 (Insoluble) de células BL21; TAF': expresión de proteína de fusión a TAF-Pro-CNP38 (Insoluble) de células BL21(DE3). B: expresión de proteína de fusión a TAF-Pro-CNP37 y BMP-Pro-CNP37. C: proteína de fusión a BMP-Pro-CNP38 y expresión de proteína de BMP. D: expresión de proteína de fusión a TAF-Pro-HSA-CNP ("Pro-GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (SEQ ID NO: 188) se denomina "Pro-HSA-CNP"). E: proteína de fusión a TAF-Pro-CNP38 y expresión de proteína de TAF.

Las Figuras 4A-C representan la escisión con ácido fórmico de cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38. A: un 50 % de escisión con ácido fórmico de sedimentos insolubles. M: marcador de proteína; U: sin escindir sedimentos insolubles; 25 °C, 37 °C, 42 °C, 55 °C: los sedimentos insolubles se escindieron en un 50 % de ácido fórmico a 25 °C, 37 °C, 42 °C o 55 °C durante 24 horas. 37 °C-S y 55 °C-S: sobrenadantes solubles de las reacciones de escisión a 37 °C y 55 °C neutralizados con NaOH 10 N y centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos. B: 10 % y 2 % de escisión con ácido fórmico de sedimentos insolubles. M: marcador de proteína; U: sedimentos insolubles sin escindir; C: TAF-Pro-CNP38 escindido con ácido fórmico; S: sobrenadante soluble después de centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos sin neutralización; P: sedimentos insolubles después de centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos sin neutralización. C: análisis de LC/MS de un 2 % y un 10 % de productos escindidos con ácido fórmico a partir de sedimentos insolubles.

Las Figuras 5A-C representan la escisión con ácido fórmico de sedimentos insolubles a diferente temperatura y tiempo de escisión con ácido fórmico. M: marcador de proteína; C: control positivo de Gly-wtCNP37 ("CNP38"); U: sedimentos insolubles sin escindir. A: 2 % de TAF-Pro-CNP38 escindido con ácido fórmico a 42 °C, 55 °C o 70 °C durante 6, 24 o 48 horas. B: 2 % de TAF-Pro-CNP38 escindido con ácido fórmico a 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C durante 17 o 24 horas. C: análisis de LC/MS de un 2 % de productos escindidos con ácido fórmico a partir de sedimentos insolubles.

La Figura 6 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) para la expresión de una proteína de fusión a TAF-CNP34. M: marcador de proteína; C: control [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: lisados de células totales; S: sobrenadante; TI: lisados de células totales inducidas; SI: sobrenadante inducido.

La Figura 7 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) para la expresión de proteínas de fusión TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38, TAF(C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38, y TAF-Pro-CNP53, en las que "Pro-CNP38" representa Pro-Gly-CNP37, M: marcador de proteína; C: control [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: lisados de células totales; TI: lisados de células totales inducidas; S: sobrenadante; SI: sobrenadante inducido.

La Figura 8 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) de los productos de escisión con ácido fórmico de las proteínas de fusión TAF-CNP34 y TAF-Pro-CNP53. M: marcador de proteína; P: control positivo de [Gly-CNP37 ("CNP38")]; U: sin escindir; C: escindido; CS: sobrenadante escindido; CP: sedimento escindido.

La Figura 9 es un cromatograma de LC/MS que muestra el pico para CNP-34 después de escisión con ácido fórmico de TAF-CNP34.

La Figura 10 es un cromatograma de LC/MS que muestra el pico para Pro-CNP53 después de escisión con ácido fórmico de TAF-Pro-CNP53.

La Figura 11 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) para la expresión de proteínas de fusión TAF(C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38 y TAF(4D/4E)-Pro-CNP38, en las que "Pro-CNP38" representa Pro-Gly-CNP37, M: marcador de proteína; C: control [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: lisados de células totales; TI: lisados de células totales inducidas; S: sobrenadante; SI: sobrenadante inducido.

La Figura 12 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) de los productos de escisión con ácido fórmico de las proteínas de fusión TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 y TAF(C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38, en las que "Pro-CNP38" representa Pro-Gly-CNP37, M: marcador de proteína; P: control positivo de [Gly-CNP37 ("CNP38")]; U: sin escindir; C: escindido; CS: sobrenadante escindido; CP: sedimento escindido.

La Figura 13 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) de los productos de escisión con ácido fórmico de las proteínas de fusión TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38 y TAF(C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38, en las que "Pro-CNP38" representa Pro-Gly-CNP37, M: marcador de proteína; P: control positivo de [Gly-CNP37 ("CNP38")]; U: sin escindir; C: escindido; CS: sobrenadante escindido; CP: sedimento escindido.

La Figura 14 es una transferencia de Western, usando un anticuerpo anti-CNP, de una proteína de fusión de of a TAF-Pro-CNP38 producida en una fermentación de 10 l de células BL21(DE3), en la que las células indujeron a DO₆₀₀ = 64 y hora 17 y "Pro-CNP38" representa Pro-Gly-CNP37.

- 5 La Figura 15 es una SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie) de fracciones de eluato de cromatografía de intercambio catiónico de SP-Sepharose de un producto de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") en bruto. A: cuerpo de inclusión (IB) de TAF-Pro-CNP38 en agua; B: IB en formiato; C: IB en formiato, neutralizado; D: sedimento o neutralizado; E: sobrenadante neutralizado; F: carga de TMAE Hi-CAP; G: flujo continuo de TMAE Hi-CAP/carga de SP-Sepharose; H: flujo continuo de SP-Sepharose; fracciones 1-47 de eluato de SP-Sepharose: 10 ul/calle.
- 10 La Figura 16 muestra el grado de resistencia de conjugados de CNP22 PEGilado N-terminal a endopeptidasa neutra (NEP) *in vitro*.
- 15 La Figura 17 representa el grado de resistencia a NEP de variantes de CNP que tienen una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal ["CNP27" es GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36)].
- La Figura 18 ilustra el grado de resistencia a NEP de CNP17 y GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27") PEGilado N-terminal (SEQ ID NO: 36).
- 20 La Figura 19 ilustra el grado de resistencia a NEP de wtCNP22 y las variantes de CNP, Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA" en las figuras) (SEQ ID NO: 144) y PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12" en las figuras) (SEQ ID NO: 36).
- 25 La Figura 20 muestra la capacidad de las variantes de CNP que tienen una prolongación de aminoácido N-terminal para estimular la producción de cGMP en células NIH3T3 *in vitro*. Los resultados son con respecto al nivel de cGMP producido en presencia de CNP22 1 uM. "CNP27" es GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).
- La Figura 21 presenta la capacidad de CNP17 y GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27") PEGilado N-terminal (SEQ ID NO: 36) para estimular la producción de cGMP en células NIH3T3.
- La Figura 22 ilustra los efectos de la PEGilación N-terminal de CNP22 en la producción de cGMP.
- 30 La Figura 23 ilustra la producción de cGMP inducida por wtCNP22 y las variantes de CNP, Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA") (SEQ ID NO: 144), wtCNP29 y PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36), en células NIH3T3.
- 35 Las Figuras 24A y B muestran que CNP-22 y Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") estimulaban la producción de cGMP a través de NPR-B con curvas de dosis-respuestas similares, y está un alcance mucho mayor que a través de NPR-A, y presentaban un perfil similar para la selectividad de NPR-B con respecto a la de NPR-C en los ensayos de competición de señalización *in vitro*.
- 40 La Figura 25 demuestra que la exposición de células de condrosarcoma de ratas a CNP22 1 hora una vez al día o 2 horas una vez al día tiene una eficacia sustancialmente similar en la inversión de la parada inducida por FGF2 del crecimiento de condrocitos como una exposición continua a CNP22.
- Las Figuras 26A y B muestran resultados de un estudio de respuesta a la dosis de efectos de CNP22 en células de condrosarcoma de rata (RCS) detenidas con FGF2.
- 45 Las Figuras 27A-D muestran que la adición de CNP22 a células RCS detenidas por FGF2 aumenta la síntesis de la matriz e inhibe parcialmente a FGF2, tal como se evalúa mediante la incorporación de ³⁵S-sulfato y ³H-Pro en o la disminución de la matriz. Paneles A y C, síntesis; B y D, degradación; A y B, medición de ³⁵S; C y D, medición de ³H. Las diferencias estadísticamente significativas se resaltan (ANOVA; *p<0,05, **p<0,01).
- 50 Las Figuras 28A-C muestran los niveles de producción de agrecano y fibronectina (ARNm, paneles A y C, y proteína, panel B) en células RCS cultivadas con FGF2 y CNP22.
- 55 La Figura 29 muestra la eficacia de CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24" en las figuras) (SEQ ID NO: 36) en la estimulación del crecimiento longitudinal del fémur de tipo silvestre en un modelo de órgano de ratón *ex vivo*.
- 60 La Figura 30 muestra crecimiento de hueso longitudinal de tibias de ratón de tipo silvestre de 2-3 días de edad tratadas con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) cada dos días. Los resultados se normalizan a mediciones antes del tratamiento (día 0). Los datos se representan como media ± ETM (n = 8).
- 65 La Figura 31 muestra crecimiento de hueso longitudinal de tibias de ratón FGFR3^{ac} acondroplásico de 2-3 días de edad tratadas con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) cada dos días. Los resultados se normalizan a mediciones antes del tratamiento (día 0). Los datos se representan como media ± ETM (n = 7-8).

- La Figura 32 muestra crecimiento de hueso longitudinal de fémures de ratón de tipo silvestre de 2-3 días de edad tratados con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) cada dos días. Los resultados se normalizan a mediciones antes del tratamiento (día 0). Los datos se representan como media \pm ETM (n = 8).
- 5 La Figura 33 muestra crecimiento de hueso longitudinal de fémures de ratón FGFR3^{ac} de 2-3 días de edad tratados con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) cada dos días. Los resultados se normalizan a mediciones antes del tratamiento (día 0). Los datos se representan como media \pm ETM (n = 3-7).
- 10 Las Figuras 34A-I representan la biodistribución de CNP37 en fémures de ratón FGFR3^{ac} tratados *ex vivo* cada dos días. Los Paneles A-C ilustran la distribución en fémures distales, los paneles D-F ilustran la distribución en condrocitos articulares y los paneles G-I ilustran la distribución en condrocitos hipertróficos.
- 15 Las Figuras 35A-C representan la celularidad de columnas proliferantes en placas de crecimiento después de tratamiento de fémures de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} con CNP22 o CNP37 cada dos días durante 8 días. (A) sin tratamiento, (B) número de células por columna después del tratamiento, (C) estudios morfológicos después del tratamiento. Los paneles en la Fig 35C(i) a C(vi) corresponden al orden de la muestra establecido en la Fig. 35B. Los datos se representan como media \pm ETM (n = 4-8).
- 20 Las Figuras 36A-C representan la hipertrofia de condrocitos después de tratamiento *ex vivo* de fémures de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} con CNP22 o CNP37 cada dos días durante 8 días. (A) sin tratamiento, (B) tamaño celular después del tratamiento, (C) estudios morfológicos después del tratamiento. Los paneles en la Fig 36C(i) a C(vi) corresponden al orden de la muestra establecido en la Fig. 36B. Los datos se representan como media \pm ETM (n = 4-9).
- 25 Las Figuras 37A-I representan la biodistribución de CNP37 en tibias de ratón FGFR3^{ac} tratadas *in vivo*. Los paneles A-C muestran la distribución en fémures distales, los paneles D-F ilustran la distribución en condrocitos articulares y los paneles G-I ilustran la distribución en condrocitos hipertróficos.
- 30 Las Figuras 38A-C ilustran los efectos *in vivo* de CNP37 en placa de crecimiento de tibias de ratón FGFR3^{ac}: (A) espesor total de la placa de crecimiento, (B) espesor de la zona proliferante, y (C) espesor de la zona hipertrófica. Los datos se representan como media \pm ETM (n = 7-15).
- 35 La Figura 39 muestra los niveles de cGMP en medios acondicionados de fémures de ratón de tipo silvestre tratados *ex vivo* con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36) ($p < 0,01$).
- La Figura 40 muestra los niveles de cGMP en medios acondicionados de fémures de ratón FGFR3^{ac} tratados *ex vivo* con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) ($p < 0,01$).
- 40 La Figura 41 representa los niveles de cGMP en medios acondicionados de tibias de ratón de tipo silvestre tratadas *ex vivo* con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) ($p < 0,01$).
- 45 La Figura 42 muestra los niveles de cGMP en medios acondicionados de tibias de ratón FGFR3^{ac} tratadas *ex vivo* con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) ($p < 0,01$).
- La Figura 43 demuestra que la exposición *ex vivo* de fémures de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} a CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) aumentaba los niveles de colágeno de tipo II escindido en los medios acondicionados ($p < 0,05$).
- 50 La Figura 44 representa la región hipertrófica de huesos femorales aislados de ratones de tipo silvestre y ratones FGFR3^{Y367C} (un modelo de ratón de acondroplasia grave) y tratados *ex vivo* con vehículo o Pro-Gly-CNP37 1 μ M ("ProCNP38") durante 6 días, demostrando que el tratamiento con Pro-Gly-CNP37 daba como resultado un aumento en el crecimiento de hueso y una prolongación en la placa de crecimiento.
- 55 La Figura 45 muestra que CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) administrados por vía intravenosa (i.v.) a ratas tienen una semivida mucho más larga y una biodisponibilidad mucho mayor en el plasma que CNP22.
- 60 La Figura 46 ilustra que PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) administrado por vía subcutánea (s.c.) A ratas también tiene una semivida mucho más larga y una biodisponibilidad mucho mayor en el plasma que CNP22.
- 65 La Figura 47 demuestra que CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) administrados i.v. estimulan un nivel mucho más elevado de producción de cGMP en ratas que CNP22.

La Figura 48 muestra que PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) administrado s.c., y en menor medida, CNP37 son sustancialmente más eficaces en la estimulación de la producción de cGMP en ratas que CNP22.

5 La Figura 49 muestra mediciones de peso corporal de ratones de tipo silvestre tratados con Gly-CNP37 o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

La Figura 50 muestra mediciones de longitud de la cola de ratones de tipo silvestre tratados con Gly-CNP37 o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

10 La Figura 51 ilustra el efecto del tratamiento de ratones FGFR3^{ac} con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud corporal ($p = 0,02$, ensayo unilateral, varianza desigual).

La Figura 52 muestra el efecto de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud de la cola en ratones FGFR3^{ac}.

15 Las Figuras 53A y B muestran el efecto de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud de huesos largos distales (A, cúbito; B, tibia) en ratones FGFR3^{ac} ($p < 0,01$, ensayo unilateral, varianza desigual).

20 Las Figuras 54A y B muestran el efecto de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud de huesos proximales (A, húmero; B, fémur) en ratones FGFR3^{ac} ($p < 0,01$, ensayo unilateral, varianza desigual).

25 La Figura 55 ilustra que la administración de CNP37 corrige la rizomelia (desproporción de la longitud de las extremidades proximales) tal como se evalúa con la proporción de fémur:tibia observada en ratones FGFR3^{ac} ($p < 0,01$, ensayo unilateral, varianza desigual).

La Figura 56 muestra el efecto de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud de la cabeza en ratones FGFR3^{ac} ($p < 0,01$ ensayo unilateral, varianza desigual).

30 La Figura 57 muestra que el tratamiento de ratones FGFR3^{ac} con CNP37 aumenta el tamaño del conducto auditivo externo (EAM) ($P = 0,03$, ensayo unilateral, varianza desigual).

35 La Figura 58 muestra el efecto de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en la longitud espinal en ratones acondroplásicos, expresado como una prolongación de cuerpos vertebrales (por ejemplo, vértebra lumbar 5).

La Figura 59 muestra que el tratamiento de ratones FGFR3^{ac} con CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) da como resultado un aumento de los niveles en plasma de cGMP 15 minutos después de la dosis.

40 La Figura 60 ilustra los niveles en suero de colágeno de tipo II escindido en ratones FGFR3^{ac} tratados 5 semanas con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

45 La Figura 61 muestra los niveles en suero de osteocalcina en ratones FGFR3^{ac} tratados 5 semanas con CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

La Figura 62 muestra los niveles en plasma de cGMP 15 minutos después de la dosis de ratones de tipo silvestre tratados con Gly-CNP37 o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) ($p < 0,05$).

50 La Figura 63 muestra los niveles en suero de colágeno de tipo II escindido en ratones de tipo silvestre tratados 5 semanas con Gly-CNP37 o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

55 Las Figuras 64-66 presentan los niveles de cGMP, colágeno de tipo II escindido y fosfatasa alcalina después de la administración de vehículo o 20 nmol/kg o 70 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") a ratones de tipo silvestre.

Las Figuras 67 y 68 representan los niveles de colágeno de tipo II escindido y fosfatasa alcalina total después de la administración de vehículo o Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") en diferentes regímenes de dosificación.

60 La Figura 69 ilustra el aumento relativo en la longitud corporal de animales tratados con Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") y vehículo en dos estudios separados (S1 y S2) en el Día 37 con respecto al Día 1.

Las Figuras 70A y B muestran cambios en la densidad mineral en el hueso (A) y en el contenido de mineral en el hueso (B) después de la administración de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38").

65

La Figura 71 muestra los niveles de cGMP en plasma 15 min después de la última dosis subcutánea de la variante de CNP, Día 36, en la que Gly-wtCNP37 es "CNP38", Pro-Gly-wtCNP37 es "Pro-CNP38", y GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (SEQ ID NO: 144) es "HSA-CNP27" en las Figuras 71-73.

5 La Figura 72 muestra niveles en suero de colágeno de tipo II escindido de ratones tratados con Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 o GHKSEVAHRFK-CNP27 (SEQ ID NO: 144).

La Figura 73 muestra niveles en suero de fosfatasa alcalina de ratones tratados con Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 o GHKSEVAHRFK-CNP27 (SEQ ID NO: 144).

10 Las Figuras 74A y B representan la desensibilización de la respuesta de cGMP después de tratamiento agudo (A) o crónico (B) con Gly-CNP37 1 uM.

15 La Figura 75A demuestra que el tratamiento diario de ratones de tipo silvestre con 200 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") durante 8 días no desensibiliza la respuesta de cGMP. La Figura 75B muestra que el tratamiento de los ratones con 200 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 una vez al día durante dos días consecutivos potenciaba la respuesta de cGMP.

20 Las Figuras 76A-D muestran que el tratamiento de ratones de tipo silvestre con 200 nmol/kg de Gly-CNP37 estimulaba la secreción de cGMP en fémures distales (cartílago y hueso) (A), cortezas femorales (hueso) (B), pabellón auricular (cartílago) (C), y riñón (D). Las Figuras 76E-H muestran que los tejidos de hígado (E), corazón (F), pulmón (G) y cerebro (H) no presentaban una secreción de cGMP apreciable como respuesta a Gly-CNP37 con respecto al control de vehículo en los momentos estudiados.

25 Las Figuras 77-82 muestran resultados de un estudio en desarrollo en monos cinomolgos jóvenes normales a los que se inyecta por vía subcutánea diariamente el vehículo o 10 o 36 ug/kg de Pro-Gly-CNP37. Ambas dosis de Pro-Gly-CNP37 presentan un aumento del ancho de la placa de crecimiento (Figura 77), aumento de las longitudes de las tibias derecha e izquierda (Figuras 78A y B), aumento de la longitud de la pierna (Figura 79), aumento de la longitud del brazo (Figura 80), aumento de la longitud corporal (Figura 81), y aumento del nivel en suero de fosfatasa alcalina (Figura 82).

30 La Figura 83 representa la representación observada de la constante de tasa de degradación (K_{obs}) con respecto al pH a pH 3-8 y 5 °C, 25 °C y 40 °C para las formulaciones de Gly-CNP37.

35 Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a nuevas variantes de CNP que tienen una reducción de la afinidad con respecto a NEP y/o NPR-C, y una reducción de la susceptibilidad a la escisión con NEP y/o eliminación con NPR-C, composiciones farmacéuticas que comprenden tales variantes de CNP, y métodos de uso de tales variantes de CNP para tratar trastornos sensibles a CNP, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos relacionados con los huesos tales como acondroplasia y trastornos asociados con células y tejidos del músculo liso vascular.

A. Definiciones

45 A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos usados en la presente solicitud, incluyendo la the memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones que se proporcionan a continuación.

50 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, los artículos indefinidos "un" y "uno" y el artículo definido "el" incluyen referentes en plural así como en singular a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

55 El término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un error aceptable para un valor en particular tal como lo determina un experto habitual en la materia, que depende en parte de cómo se mide o se determina el valor. En ciertas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a dentro de 1, 2, 3 o 4 desviaciones estándar. En ciertas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a dentro de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o un 0,05 % de un valor o intervalo dado. Siempre que el término "alrededor de" o "aproximadamente" preceda al primer valor numérico en 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 en esa serie.

60 Los términos "temperatura ambiente" y "temperatura ambiente" se usan indistintamente en el presente documento y hacen referencia a la temperatura del entorno circundante (por ejemplo, la habitación en la que se realiza una reacción o se almacena una composición). En ciertas realizaciones, la temperatura ambiente o la temperatura de la habitación está en un intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 28 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 28 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, o de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 28 °C, o de aproximadamente 22 °C a

65

aproximadamente 25 °C. En otras realizaciones, la temperatura ambiente o la temperatura de la habitación es de aproximadamente 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C o 28 °C.

5 La definición de términos de química convencional se puede encontrar en trabajos de referencia, que incluyen Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª Edición, Vols. A y B (Plenum Press, New York 1992). La práctica de la presente divulgación puede usar, a menos que se indique de otro modo, ciertos métodos convencionales de química orgánica sintética, espectrometría de masas, cromatografía preparativa y analítica, química de proteínas, bioquímica, tecnología de ADN recombinante y farmacología, dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman y Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4ª Edición, 2004); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

15 Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se usan a través de todo el texto:

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)
Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

20 "Polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero formado por restos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural, y análogos sintéticos que se producen de forma natural de los mismos, unidos a través de enlaces peptídicos o isoésteres de enlace peptídico. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. Los términos "polipéptido" y "proteína" no están limitados a una longitud mínima del producto. El término "proteína" por lo general se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" por lo general se refiere a polipéptidos cortos. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros, y similares, están incluidos dentro de la definición. En la definición están incluidas tanto las proteínas de longitud completa como fragmentos de las mismas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también incluyen modificaciones del polipéptido o proteína después de su expresión, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para fines de la presente divulgación, un "polipéptido" puede incluir "modificaciones", tales como deleciones, adiciones, sustituciones (que pueden ser de naturaleza conservativa o pueden incluir sustituciones con cualquiera de los 20 aminoácidos que normalmente están presentes en proteínas humanas, o cualquier otro aminoácido de origen natural o no natural o atípico), y modificaciones químicas (por ejemplo, adición de dos sustituciones con peptidomiméticos), a la secuencia nativa. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o a través de modificación química de aminoácidos para retirar o unir restos químicos, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones que surgen con hospedadores que producen las proteínas o a través de errores debidos a la amplificación de PCR.

35 En el presente documento se usa una notación convencional para representar secuencias de polipéptidos: el final hacia el lado izquierdo de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino-terminal; el final hacia el lado derecho de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo-terminal.

40 "Sustitución conservativa" se refiere a una sustitución de un aminoácido en un polipéptido con un aminoácido natural o no natural, funcional, estructurado químicamente similar. En una realización, cada uno de los siguientes grupos contiene aminoácidos naturales que son sustituciones conservativas entre sí:

- (1) Alanina (A) Serina (S), Treonina (T);
- (2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 45 (3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- (4) Arginina (R), Lisina (K);
- (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

50 En otra realización, cada uno de los siguientes grupos contiene aminoácidos naturales que son sustituciones conservativas entre sí:

- (1) Glicina (G), Alanina (A);
- 55 (2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- (3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- (4) Arginina (R), Lisina (K);

- (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V), Alanina (A);
- (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); y
- (7) Serina (S), Treonina (T), Cisteína (C).

5 En una realización más, los aminoácidos se pueden agrupar como se establece a continuación:

- (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- 10 (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la estructura principal: Gly, Pro; y
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

15 En una realización, los péptidos o polipéptidos que se describen en el presente documento se generan a través de medios recombinantes, usando un polinucleótido que codifica una variante de CNP. Por lo tanto, la divulgación incluye polinucleótidos que codifican cualquiera de las variantes de CNP que se describen en el presente documento, células hospedadoras o vectores que comprenden tales polinucleótidos, unidos opcionalmente a secuencias de control de expresión, y métodos de uso de tales polinucleótidos, vectores o células hospedadoras para producir variantes de CNP de la divulgación. Las variantes de CNP expresadas por tales polinucleótidos se pueden producir con métodos que incluyen cultivar de células hospedadoras en medio de cultivo en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica una variante de CNP, y aislar el producto de expresión product de las células hospedadoras o medio de cultivo. Los productos de expresión reales pueden variar ligeramente del producto de proteína codificada dependiendo de cualquier procesamiento posterior a la traducción.

25 "Polinucleótido" se refiere a un polímero formado por unidades de nucleótido. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, tales como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN") así como análogos de ácido nucleico. La expresión "ácido nucleico" por lo general se refiere a polinucleótidos grandes. El término "oligonucleótido" por lo general se refiere a polinucleótidos cortos, por lo general no superiores a aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se representa con una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), la secuencia de nucleótidos también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" sustituye a "T". "ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico con un ARNm, en cualquier forma monocatenaria o bicatenaria.

35 "Secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos que regula la expresión de una secuencia de nucleótidos unida a la misma de forma operativa. "Unida de forma operativa" se refiere a una relación funcional entre dos partes en las que la actividad de una parte (por ejemplo, la capacidad para regular la transcripción) da como resultado una acción en la otra parte (por ejemplo, transcripción de la secuencia). La expresión de secuencias de control puede 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 corte y empalme para intrones, y codones de parada.

45 "Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no se unen de forma natural entre sí. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado se puede incluir en un vector adecuado, y el vector se puede usar para transformar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". A continuación, el gen se expresa en la célula hospedadora recombinante para producir, por ejemplo, un "polipéptido recombinante". Un polinucleótido recombinante también puede servir para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosoma, *etc.*).

50 "Quimera", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que comprende al menos dos secuencias heterólogas de polinucleótidos o polipéptidos (es decir, que se obtienen a partir de diferentes fuentes o no se asocian entre sí como una secuencia de origen natural) que se unen o relacionan directa o indirectamente usando técnicas usadas normalmente en la técnica, por ejemplo, expresión recombinante o reticulación química. En una realización, la secuencia heteróloga puede comprender una proteína o péptido unido directa o indirectamente a un péptido o variante de CNP, que incluye proteína su péptidos que se pueden escindir del péptido o variante de CNP. En una realización relacionada, las variantes de CNP son quimeras como se describe en el presente documento.

60 En ciertas realizaciones, las quimeras incluyen proteínas de fusión a CNP que comprenden una etiqueta de proteína o péptido vehículo escindible. La expresión "proteína vehículo escindible" o "etiqueta peptídica escindible" se refiere a una secuencia de péptidos o polipéptidos que se puede fusionar, directa o indirectamente a través de un conector, a una secuencia de polipéptidos heteróloga, y que se puede retirar de la secuencia heteróloga usando una gente que escinde o separa del péptido o polipéptido escindible del polipéptido o proteína heterólogos. En algunas realizaciones, la etiqueta de proteína o péptido vehículo escindible aumenta la generación, purificación y/o detección de la proteína de fusión o el polipéptido heterólogo. Las p etiquetas de proteínas y péptidos vehículo escindibles a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, factor de transcripción humano TAF12 (TAF12), cetosteroide

isomerasa (KSI), proteína de unión a maltosa (MBP), β -galactosidasa (β -gal), glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina (Trx), dominio de unión a quitina (CBD), mutación BMP-2 (BMPM), SUMO, CAT, TrpE, proteína A estafilocócica, proteínas estreptocócicas, proteína de unión a almidón, dominio de endoglucanasa A de unión a celulosa, dominio de endoglucanasa Cex de unión a celulosa, dominio de unión a biotina, recA, Flag, c-Myc, poli(His), poli(Arg), poli(Asp), poli(Gln), poli(Phe), poli(Cys), proteína fluorescente de color verde, proteína fluorescente de color rojo, proteína fluorescente de color amarillo, proteína fluorescente de color cian, biotina, avidina, estreptavidina, epítopos de anticuerpo, y fragmentos de los mismos.

Un "agente de escisión" es un agente que es útil para escindir o separar, por ejemplo, a un péptido o polipéptido escindible de un polipéptido o proteína heterólogos. Los agentes de escisión a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, paladio, bromuro de cianógeno (CNBr), ácido fórmico, hidroxilamina, clostridolor, trombina, quimotripsina, tripsina, proteasas similares a la tripsina, carboxipeptidasa, enteroquinasa (enteropeptidasa), proteasa de Kex 2, proteasa de Omp T, proteasa de Factor Xa, subtilisina, proTEV, proteasa de SUMO, proteasa de V8, proteasa del VIH, proteasa de rinovirus, proteasa de furilisina, proteasas de IgA, proteasa de Pace humano, colagenasa, proteasa de Nia, proteasa de 2Apro de poliovirus, proteasa de 3C de poliovirus, genenasa, furina, elastasa, Proteinasa K, pepsina, renina (quimosina), proteasas aspárticas microbianas, padolor, caldolor, quimopadolor, ficina (ficaína), bromelaína (bromelasa), catespisina B, caspasas, termolisina, Endoproteasa Arg-C, Endoproteasa Glu-C, Endoproteasa Lys-C, kalikreína, y plasmina.

Los términos "idéntico" y porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o sub secuencias que son las mismas obtienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

La expresión "sustancialmente homólogo" o "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, por lo general se refiere a dos o más secuencias o sub secuencias que tienen una identidad del resto de nucleótidos o aminoácidos de al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o un 98 %, cuando se compara y se alinea para correspondencia máxima, tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En ciertas realizaciones, la homología o identidad sustancial existe con respecto a regiones de las secuencias que tienen una longitud de al menos aproximadamente su 25, 50, 100 o 150 restos. En otra realización, las secuencias son sustancialmente homólogo asco idénticas con respecto a la toda la longitud de cualquiera o ambos biopolímeros de comparación.

Para comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como una secuencia de referencia a, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se diseñan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calculó el porcentaje de identidad de secuencias para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación se puede realizar, por ejemplo, con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482 (1981), con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443 (1970), mediante la búsqueda con el método de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Grupo de Genética Informática, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP, que usa una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 (1987) y es similar al método que describen Higgins y Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989). Otro algoritmo útil para generar alineamientos múltiples de secuencias es Clustal W (Thompson *et al.*, Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias es el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990); Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915 (1989); Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787 (1993)). El software para realizar análisis de BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente homólogas o homólogas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene una reactividad cruzada de forma inmunológica con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido por lo general es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, en el que los dos polipéptidos se diferencian solamente por sustituciones conservativas. Otra indicación de que las secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe en el presente documento.

"Sustancialmente pura" o "aislada" se refiere a una especie objeto que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar, más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición),

y una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente un 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En una realización, una composición sustancialmente pura se refiere a que la especie de interés comprende al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o más de las especies macromoleculares presentes en la composición en una base molar o de peso. La especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición con métodos de detección convencionales) si la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular. Las especies de disolvente, moléculas pequeñas (< 500 Daltons), estabilizantes (por ejemplo, BSA), y especies iónicas elementales no se consideran especies macromoleculares para fines de la presente definición. En una realización, los compuestos de la divulgación son sustancialmente puros o aislados. En otra realización, los compuestos de la divulgación son sustancialmente puros o aislados con respecto a los materiales de partida macromoleculares usados en su producción. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas de la divulgación comprenden una variante de CNP sustancialmente pura o aislada en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente con otro agente biológicamente activo.

"De origen natural" tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) y que no ha sido modificado de forma intencionada por el ser humano en el laboratorio es de origen natural. En una realización, una sustancia "de origen natural" es de origen humano.

"Tipo silvestre" (wt) es un término que se refiere a la forma natural, incluyendo la secuencia, de un polinucleótido, polipéptido o proteína en una especie. Una forma de tipo silvestre se distingue de una forma mutante de un polinucleótido, polipéptido o proteína que surge de una mutación o mutaciones genéticas.

En una realización, un primer polipéptido que es un "análogo" o "variante" o "derivado" de un segundo polipéptido es un polipéptido que tiene una homología de secuencias de al menos aproximadamente un 50 %, 60 % o 70 %, pero una homología de secuencia es inferior a un 100 %, con el segundo polipéptido. Tales análogos, variantes o derivados pueden estar comprendidos por restos de aminoácidos de origen no natural, que incluyen, pero no se limitan a, homoarginina, ornitina, penicilamina, y norvalina, así como restos de aminoácidos de origen natural. Tales análogos, variantes o derivados también ponen estar formados por uno o una pluralidad de restos de D-aminoácidos, y también pueden contener peptidomiméticos o isoésteres de enlace peptídico tales como enlaces no peptídicos entre dos o más restos de aminoácido o peptidomimético. En otra realización, un primer polipéptido es un "análogo", "variante" o "derivado" de un segundo polipéptido si el primer polipéptido no es un producto de escisión conocido del segundo polipéptido o no es un precursor conocido del segundo polipéptido, incluso si el primer polipéptido tiene una homología de secuencias de un 100 % con respecto al segundo polipéptido o tiene una secuencia de tipo silvestre.

En una realización, la expresión "obtenida a partir de", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de polipéptidos o péptidos que se basa en una secuencia de polipéptidos o péptidos de tipo silvestre o de origen natural y que puede tener una o más deleciones, adiciones, y/o sustituciones con aminoácidos naturales, o peptidomiméticos no naturales. En una realización, la secuencia derivada comparte una similitud de secuencias de al menos aproximadamente un 40 %, 50 %, 60 % o un 70 %, pero inferior a un 100 %, con la secuencia de tipo silvestre o de origen natural (por ejemplo, homóloga en al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 %) con respecto al polipéptido de tipo silvestre con respecto a una longitud de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos. Además, en otra realización, un polipéptido se "obtiene a partir de" un polipéptido de tipo silvestre se tiene un resto (por ejemplo, un polímero tal como, por ejemplo, PEG) unido directa o indirectamente al mismo que no está presente en el polipéptido de tipo silvestre, incluso si ambos polipéptidos comparten una homología de un 100 % en su secuencia de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, un polipéptido "derivado de NPPC" se refiere a un polipéptido tenido a partir del polipéptido precursor de péptido natriurético C (NPPC), que es un pre-pro polipéptido de 126 aminoácidos de una sola cadena, y que por último después de escisión da como resultado wtCNP22. La retirada del péptido señal de NPPC proporciona pro-CNP, y la escisión adicional con la endoproteasa furina genera un péptido de 53 aminoácidos activo (CNP-53), que se secreta y se escinde de nuevo con una enzima desconocida para producir el péptido de 22 aminoácidos maduro (CNP, o CNP-22). Por lo tanto, el propio CNP22 es un polipéptido "derivado de NPPC" en virtud de su obtención a partir de NPPC. En una realización, un polipéptido derivado de NPPC es homólogo en al menos aproximadamente un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % con el NPPC de tipo silvestre con respecto al mismo número de restos de aminoácidos. Además, se contempla que un péptido derivado de NPPC puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 53, o de 1 a 37, o de 1 a 35, o de 1 a 31, o de 1 a 27, o de 1 a 22, o de 10 a 35, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 37 restos del polipéptido NPPC. En una realización, un péptido derivado de NPPC 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 obtenida a partir del polipéptido NPPC.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una dosificación suficiente para producir un resultado deseado en una afección, patología o enfermedad en la salud de un sujeto o para un fin de diagnóstico. El resultado deseado puede

- comprender una mejora subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación. "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente eficaz para producir el efecto beneficioso pretendido en la salud. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual la puede determinar alguien con experiencia habitual en la materia usando experimentación de rutina. Se entenderá que el nivel de dosis específica y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente en particular puede variar y dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico usado; la biodisponibilidad, estabilidad metabólica, tasa de excreción y duración de la acción de ese compuesto; el modo y tiempo de administración del compuesto; la edad, peso corporal, salud en general, sexo y dieta del paciente; y la gravedad de la afección en particular.
- 5 "Tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico o tratamiento de diagnóstico. En ciertas realizaciones, "tratamiento" se refiere a la administración de un compuesto o composición a un sujeto para fines terapéuticos, profiláctico sobre diagnóstico.
- 10 Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presentan signos de una enfermedad o presenta solamente signos tempranos de la enfermedad, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los compuestos o composiciones de la divulgación se pueden administrar como un tratamiento profiláctico para reducir la probabilidad de desarrollar una patología o para minimizar la gravedad de la patología, si se desarrollara.
- 15 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos o síntomas de patología 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 divulgación también se pueden administrar como un tratamiento terapéutico o para diagnóstico.
- 20 "Diagnóstico" se refiere a la identificación de la presencia, alcance y/o naturaleza de una afección patológica. Los métodos de diagnóstico se diferencian en su especificidad y selectividad. Aunque un método de diagnóstico en particular no puede proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.
- 25 "Biomarcador asociado a hueso o cartílago" o "marcador asociado a hueso o cartílago" se refiere a un factor de crecimiento, enzima, proteína, u otra sustancia o resto biológicamente detectables cuyo nivel aumenta o disminuye en asociación con, por ejemplo, renovación de cartílago, formación de cartílago, crecimiento de cartílago, resorción ósea, formación de hueso, crecimiento de hueso, o combinaciones de los mismos. Tales biomarcadores se pueden medir antes, durante y/o después de la administración de una variante de CNP como se describe en el presente documento. Los biomarcadores asociados a hueso o cartílago a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, CNP, cGMP, propéptidos de colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo II y fragmentos del mismo, propéptidos de colágeno de tipo I y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo I y fragmentos del mismo, osteocalcina, antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), sulfato de agregano y condroitina, y fosfatasa alcalina. Los biomarcadores asociados a cartílago y hueso se pueden medir en cualquier muestra biológica apropiada, que incluye, pero no se limita a, tejidos, sangre, suero, plasma, fluido cerebroespinal, fluido sinovial y orina. En algunas realizaciones, los biomarcadores se miden en sangre, plasma o suero a partir de animales que se someten a estudios de eficacia/farmacodinámica *in vivo* y/o a partir de los medios acondicionados de estudios *ex vivo*.
- 30 En ciertas realizaciones, se mide el nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago y la cantidad o frecuencia de la administración de la variante de CNP administrará a un sujeto se puede ajustar de acuerdo con el nivel del biomarcador medido. En algunas realizaciones, el nivel de biomarcador está "por debajo de un nivel diana" o "por encima de un nivel diana". Un nivel diana de un biomarcador es un nivel o intervalo de niveles del biomarcador en los que un efecto terapéutico se observa en el sujeto que recibe la variante de CNP. En ciertas realizaciones, el nivel diana de un biomarcador para un sujeto que tiene un trastorno o afección sensible a CNP es el nivel o intervalo de niveles del biomarcador observados en un sujeto no afectado, normal. En otras realizaciones, para indicar un efecto terapéutico, no es necesario que el nivel diana de un biomarcador sea equivalente al nivel o intervalo de niveles del biomarcador observado en un sujeto normal, pero puede estar dentro de, por ejemplo, un 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o un 5 % del nivel o intervalo de niveles "normales" del biomarcador observado en un sujeto no afectado.
- 35 40 45 50 55 Por ejemplo, si el nivel de un biomarcador aumenta en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago, el nivel diana del biomarcador que indica un efecto terapéutico puede ser más elevado que al nivel del biomarcador en pacientes que padecen un trastorno sensible a CNP a los que no se les ha administrado una variante de CNP, y puede ser opcionalmente más bajo que el nivel o niveles "normales", a aproximadamente el nivel o niveles "normales", o superior al el nivel o niveles "normales" del biomarcador en sujetos que no padecen ese trastorno. En una realización, si el nivel de un biomarcador es inferior a un nivel diana, éste indica un efecto terapéutico inadecuado, que puede requerir un aumento de la cantidad frecuencia de administración de la variante de CNP administrada. En una realización relacionada, si el biomarcador es superior a un nivel diana, éste indica que se ha administrado más variante de CNP de la necesaria, lo que puede requerir una disminución de la cantidad o frecuencia de administración de la variante de CNP administrada.
- 60 65

Como otro ejemplo, si el nivel de un biomarcador disminuye en asociación con la formación o crecimiento de hueso o cartílago, el nivel diana del biomarcador que indica un efecto terapéutico puede ser menor que el nivel del biomarcador en pacientes que padecen un trastorno sensible a CNP a los que no se les ha administrado una variante de CNP, y opcionalmente puede ser más elevado que el nivel o niveles "normales", a aproximadamente el nivel o niveles "normales", o inferior a nivel o niveles "normales" del biomarcador en sujetos que no padecen ese trastorno. En tal caso, se puede aplicar lo contrario a los ajustes mencionados anteriormente en una cantidad y frecuencia de administración de variante de CNP.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un animal sujeto, incluyendo seres humanos y mamíferos. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de CNP, opcionalmente otro agente biológicamente activo, y la opcionalmente un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición farmacéutica incluye una composición que comprende el principio o principios activos, y el ingrediente o ingredientes inertes que forman el vehículo, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de cualquiera de dos o más de los ingredientes, o a partir de disociación de uno o más de los ingredientes, o a partir de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen cualquier composición preparada por combinación de un compuesto de la divulgación y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos, tampones, farmacéuticos convencionales, y similares, tales como una solución salina tamponada con fosfato, solución acuosa de dextrosa al 5 %, y emulsiones (por ejemplo, una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite). Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen adyuvantes, aglutinantes, cargas, diluyentes, agentes disgregantes, agentes emulgentes, agentes humectantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes y agentes colorantes. Los vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente adecuados se describen en *Pharmaceutical Sciences* de Remington, 19ª Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Los vehículos farmacéuticos preferentes dependen del modo de administración pretendido del agente activo. Los modos de administración habituales incluyen administración enteral (por ejemplo, oral) o parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal; o administración tópica, transdérmica, o transmucosal).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que se puede formular en un compuesto para uso farmacéutico, que incluye, pero no se limita a, sales metálicas (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, *etc.*) y sales de amoniaco o aminas orgánicas.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se hace referencia a un material que no es biológicamente ni de otro modo no deseado, es decir, el material se puede administrar a un individuo sin causar ningún efecto biológico no deseado o sin interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido el mismo o con cualquier componente presente sobre o en el cuerpo del individuo.

La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, con cada unidad conteniendo una cantidad determinada previamente de un compuesto de la divulgación calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, opcionalmente en asociación con un excipiente, diluyente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de la presente divulgación dependen del compuesto en particular usado y del efecto a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedador.

"Condiciones fisiológicas" se refiere a condiciones en el cuerpo de un animal (por ejemplo, un ser humano). Las condiciones fisiológicas incluyen, pero no se limitan a, temperatura corporal y un buen entorno acuoso de fuerza iónica fisiológica, pH y enzimas. Las condiciones fisiológicas también incluyen condiciones en el cuerpo de un sujeto en particular que se diferencian de las condiciones "normales" presentes en la mayoría de los sujetos, por ejemplo, que son diferentes a la temperatura del cuerpo humano normal de aproximadamente 37 °C o se diferencian del pH de la sangre humana normal de aproximadamente 7,4.

Por "pH fisiológico" o un "pH en un intervalo fisiológico" se hace referencia a un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a 8,0 inclusive, de forma más habitual en el intervalo de aproximadamente 7,2 a 7,6 inclusive.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase de mamíferos: seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés, a y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pájaros, peces y similares. El término no indica una edad o género en particular.

Los términos "polietilenglicol", "PEG", "óxido de polietileno" y "PEO" se usan indistintamente en el presente documento a menos que se indique de otro modo. Un péptido CNP (CNP22 o una variante del mismo) conjugado a través de un grupo amino a un polímero "PEOn" asociado con el número n, en general tiene la fórmula: $\text{CH}_3\text{-}[\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_n\text{-C(=O)-NHR}$, en la que n es el número de unidades de óxido de etileno y R representa el resto del péptido. El polímero "PEOn" puede tener opcionalmente un grupo alquileo, $(\text{CH}_2)_m$, en el que m es un número entero de 1 a 5, entre el carbono del carbonilo y las unidades de repetición de óxido de etileno. Un polímero del tipo "PEOn" (por ejemplo, PEO12 o PEO24) es monodisperso, es decir, es un solo polímero separado de un peso molecular en particular. De forma análoga, un péptido CNP conjugado a través de un grupo amino a un polímero "PEGnK" asociado con el número nK, en general tiene la fórmula: $\text{CH}_3\text{-}[\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_p\text{-C(=O)-NHR}$, en la que p es un número entero mayor que 1. El polímero de tipo "PEGnK" también puede tener can opcionalmente un grupo alquileo, $(\text{CH}_2)_m$, en el que m es un número entero de 1 a 5, entre el carbono del carbonilo y las unidades de repetición de óxido de etileno. Sin embargo, el polímero de tipo "PEGnK" (por ejemplo, PEG1K, PEG2K, PEG5K o PEG20K) es polidisperso, es decir, contiene una mezcla de polímeros que tienen una distribución de pesos moleculares, en el que el número nK representa el peso molecular medio en número del polímero (M_n) en kilo Daltons. Por ejemplo, el "PEG2K" conjugado con un péptido CNP representa un polímero de PEG polidisperso que tiene un peso molecular medio el número de polímero de aproximadamente 2 kDa.

Cuando un intervalo de la masa de un polímero (por ejemplo, PEG) se proporciona (por ejemplo, en unidades de kDa), el intervalo se refiere a un intervalo de pesos moleculares medios en número de polímero, no a un intervalo de pesos moleculares de múltiples polímeros en una mezcla polidispersa, a menos que se indique de forma expresa de otro modo.

El término "halógeno", "haluro" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo, e/o yodo.

El término "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal o ramificado, en el que el alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el alquilo es un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal que tiene de 1 a 20 (C_{1-20}), 1 a 15 (C_{1-15}), 1 a 12 (C_{1-12}), 1 a 10 (C_{1-10}), o 1 a 6 (C_{1-6}) átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 20 (C_{3-20}), 3 a 15 (C_{3-15}), 3 a 12 (C_{3-12}), 3 a 10 (C_{3-10}), o 3 a 6 (C_{3-6}) átomos de carbono. Como se usa en el presente documento, los grupos alquilo C_{1-6} lineal y C_{3-6} ramificado también se denominan "alquilo inferior." Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo (incluyendo todas las formas isoméricas, que incluyen n-propilo e isopropilo), butilo (incluyendo todas las formas isoméricas, que incluyen n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo), pentilo (incluyendo todas las formas isoméricas), y hexilo (incluyendo todas las formas isoméricas). Por ejemplo, alquilo C_{1-6} se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal de 1 a 6 átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono.

El término "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo. En ciertas realizaciones, un grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento.

El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más átomos de haluro. En ciertas realizaciones, un grupo haloalquilo está sustituido con uno, dos, tres, cuatro cinco o seis átomos de haluro. En ciertas realizaciones, un grupo haloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q adicionales como se describe en el presente documento.

El término "cicloalquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo monovalente unido por puente y/o no unido por puente saturado cíclico, que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el cicloalquilo tiene de 3 a 20 (C_{3-20}), de 3 a 15 (C_{3-15}), de 3 a 12 (C_{3-12}), de 3 a 10 (C_{3-10}), o de 3 a 7 (C_{3-7}) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, decalinilo, y adamantilo.

El término "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un sistema de anillos no aromático monocíclico o un sistema de anillos policíclico que contiene al menos un anillo no aromático, en el que uno o más de los átomos no aromáticos en el anillo son heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S o N, y los átomos no aromáticos restantes en el anillo son átomos de carbono. En ciertas realizaciones, el grupo heterociclilo o heterocíclico tiene de 3 a 20, de 3 a 15, de 3 a 10, de 3 a 8, de 4 a 7, o de 5 a 6 átomos en el anillo. En ciertas realizaciones, el heterociclilo es un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico, o tetracíclico, que puede incluir un sistema de anillos fusionados o unidos por puente, y en el que los átomos de nitrógeno o azufre pueden estar opcionalmente oxidados, los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados, y algunos anillos pueden estar parcial o totalmente saturados, o ser aromáticos. El heterociclilo se puede unir a la estructura principal de cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de un compuesto estable. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, acridinilo, azepinilo, benzoimidazolilo, benzindolilo, benzoisoxazolilo, benzoisoxazinilo, benzodioxanilo, benzodioxolilo, benzofuranonilo, benzofuranilo, benzonaftofuranilo, benzopiranonilo, benzopiranoilo, benzotetrahidrofuranilo, benzotetrahidrotienilo, benzotiadiazolilo, benzotiazolilo, benzotiofenilo, benzotriazolilo, benzotripiranilo, benzoxazinilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, β -carbolinilo, carbazolilo, cromanilo, chromonilo, cinnolinilo, coumarinilo, decahidroisoquinolinilo,

dibenzofuranilo, dihidrobenzoisotiazinilo, dihidrobenzoisoxazinilo, dihidrofurilo, dihidropiranoilo, dioxolanoilo, dihidropirazinilo, dihidropiridinilo, dihidropirazolilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dioxolanoilo, 1,4-ditianilo, furanoilo, furanoilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, imidazopiridinilo, imidazotiazolilo, indazolilo, indolinilo, indolizinoilo, indolilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienoilo, isobenzotienoilo, isocromanoilo, isocoumarinoilo, isoindolinoilo, isoindolilo, isoquinolinoilo, isotiazolidinilo, isotiazolilo, isoxazolidinilo, isoxazolilo, morfolinoilo, naftiridinoilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, oxadiazolilo, oxazolidinonoilo, oxazolidinilo, oxazolopiridinilo, oxazolilo, oxiranoilo, perimidinoilo, fenantridinoilo, fenatrolinoilo, fenarsazinoilo, fenazinoilo, fenotiazinoilo, fenoxazinoilo, ftalazinoilo, piperazinoilo, piperidinoilo, 4-piperidonoilo, pteridinoilo, purinoilo, pirazinoilo, pirazolidinilo, pirazolilo, piridazinoilo, piridinoilo, piridopiridinilo, pirimidinoilo, pirrolidinoilo, pirrolinoilo, pirrolilo, quinazolinoilo, quinolinoilo, quinoxalinoilo, quinuclidinoilo, tetrahidrofurilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinoilo, tetrahidropiranoilo, tetrahidrotienoilo, tetrazolilo, tiadiazolopirimidinoilo, tiadiazolilo, tiamorfolinoilo, tiazolidinoilo, tiazolilo, tienilo, triazinoilo, triazolilo, y 1,3,5-tritianoilo. En ciertas realizaciones, un grupo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento.

El término "arilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o un grupo aromático monovalente policíclico que contiene al menos un anillo de hidrocarburo aromático. En ciertas realizaciones, el arilo tiene de 6 a 20 (C_{6-20}), de 6 a 15 (C_{6-15}), o de 6 a 10 (C_{6-10}) átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, fluorenoilo, azulenoilo, antrilo, fenantrilo, pirenoilo, bifenilo, y terfenilo. Arilo también se refiere a anillos de carbono bicíclicos o tricíclicos, en los que al menos uno de los anillos es aromático y los otros pueden estar saturados, parcialmente insaturados, o aromáticos, por ejemplo, dihidronaftilo, indenilo, indanoilo, y tetrahidronaftilo (tetralinoilo). En ciertas realizaciones, un grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o un grupo aromático policíclico que contiene al menos un anillo aromático, en el que al menos un anillo aromático contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre O, S, y N. Cada anillo de un grupo heteroarilo puede contener uno o dos átomos de O, uno o dos átomos de S, y/o de uno a cuatro átomos de N átomos, con la condición de que el número total de heteroátomo sin cada anillo sea cuatro o menos y cada anillo contenga al menos un átomo de carbono. El heteroarilo se puede unir a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de un compuesto estable. En ciertas realizaciones, el heteroarilo tiene de 5 a 20, de 5 a 15, o de 5 a 10 átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico incluyen, pero no se limitan a, pirrolilo, pirazolilo, pirazolinoilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, furanoilo, tienilo, oxadiazolilo, piridilo, pirazinoilo, pirimidinoilo, piridazinoilo, y triazinoilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo bicíclico incluyen, pero no se limitan a, indolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzotienoilo, quinolinoilo, tetrahidroisoquinolinoilo, isoquinolinoilo, benzoimidazolilo, benzopiranoilo, indolizinoilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, chromonoilo, coumarinoilo, cinnolinoilo, quinoxalinoilo, indazolilo, purinoilo, pirrolopiridinilo, furopiridinilo, tienopiridinilo, dihidroisoindolilo, y tetrahidroquinolinoilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo tricíclico incluyen, pero no se limitan a, carbazolilo, benzindolilo, fenantrolinoilo, acridinoilo, fenantridinoilo, y xantenilo. En ciertas realizaciones, un grupo heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Q como se describe en el presente documento.

La expresión "opcionalmente sustituido" pretende indicar que un grupo, que incluye alquilo, alcoxi, haloalquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, puede estar sustituido con uno o más sustituyentes Q (en una realización, uno, dos, tres o cuatro sustituyentes Q), en el que cada Q se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en ciano, halo, oxo, nitro, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , halo-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , heterociclilo, arilo C_{6-14} , heteroarilo, $-C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^f$, $-NR^eC(O)OR^f$, $-NR^eC(O)NR^fR^g$, $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^f$, $-NR^eS(O)_2R^f$, $-NR^eS(O)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $-SR^e$, $-S(O)R^e$, $-S(O)_2R^e$, y $-S(O)_2NR^fR^g$, en los que cada R^e , R^f , R^g , y R^h es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-7} , heterociclilo, arilo C_{6-14} , o heteroarilo; o R^f y R^g , junto con el átomo de N al que se unen, forman heterociclilo.

B. Variantes de CNP

El uso de CNP22 como un agente terapéutico está limitado por su corta semivida en plasma (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). En el plasma humano, la concentración de CNP22 por lo general es inferior a cinco picomolar. CNP22 se degrada y se elimina de la circulación por NEP y NPR-C en seres humanos (Growth Hormone & IGF Res., 16: S6-S14). En todos los estudios en seres humanos y animales que usan CNP22 administrado por vía sistémica, se ha usado una infusión continua para aumentar la concentración de CNP22 en los sujetos. Un péptido CNP que tiene una semivida más larga y un nivel de funcionalidad al menos similar podría ser beneficioso para una estrategia terapéutica basada en CNP. Las variantes de CNP también se desvelan en la Solicitud Internacional relacionada n.º PCT/US08/84270, incorporará de forma específica en el presente documento por referencia.

La presente divulgación proporciona variantes de CNP que tienen una reducción de la afinidad con respecto a NEP y/o NPR-C, y una reducción de la susceptibilidad con respecto a la escisión por NEP y/o eliminación por NPR-C, pero que tienen una funcionalidad sustancialmente similar o mejor que la del CNP22 de tipo silvestre. La reducción de la susceptibilidad de las variantes de CNP con respecto a la escisión por NEP y/o eliminación por y NPR-C podría aumentar la semivida en plasma o en suero de las variantes, aumentando de ese modo la oportunidad para las

variantes para distribuirse a los tejidos y sitios diana y para efectuar los efectos farmacológicos deseados. En ciertas realizaciones, las variantes de CNP descritas en el presente documento tienen una reducción de la susceptibilidad con respecto a la escisión por NEP y/o eliminación por NPR-C *in vitro* o *in vivo* en al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, o 5 veces en comparación con wtCNP22, y tienen un aumento de la semivida en plasma o en suero *in vivo* de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, o 5 veces en comparación con wtCNP22, a la vez que se retiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de la funcionalidad de wtCNP22, o que tienen una funcionalidad de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, o 5 veces superior a la de wtCNP22. La funcionalidad de CNP se puede evaluar en términos de, por ejemplo, el nivel de uno o más biomarcadores (por ejemplo, cGMP) asociados con la formación o crecimiento de cartílago o de hueso en un estudio *in vitro* o *in vivo*, la longitud de los huesos en particular en un estudio *ex vivo* o *in vivo*, etc.

Los sustratos naturales de NEP son péptidos pequeños y natriuréticos (de aproximadamente 2,2 a aproximadamente 3,2 kDa) que son los más grandes de los sustratos naturales natural. De acuerdo con análisis de cristalografía de rayos X, el sitio activo de NEP está interno dentro de la cavidad central, limitando de forma eficaz el tamaño de las moléculas de sustrato a no más de aproximadamente 3 kDa (Oefner *et al.*, J. Mol. Biol., 296: 341-349 (2000)). Basándose en estudios de señalización de NPR-B, las variantes de CNP-22, tales como CNP-17 (que retiene solamente el dominio cíclico, Cys6 - Cys22, de CNP22) y CNP-53 (CNP-22 con una prolongación de 31 aminoácidos en el extremo N-terminal), aún se puede unir y activar a NPR-B de manera similar a la del wtCNP-22 de 2,2 kDa. Por consiguiente, la divulgación incluye variantes de CNP conjugadas a un polímero natural (por ejemplo, péptido) y/o sintético (por ejemplo, PEG) en el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o variantes del mismo, que presentan un aumento de la resistencia a NEP pero que tienen la capacidad para unirse y activar el receptor de la señalización de NPR-B.

En el presente documento se enseñan variantes de CNP representadas por la fórmula general:

(x)-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-Ly₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 139), o

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-Lys₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 140), en la que:

(x) y (z) cada uno independientemente son un polímero natural (por ejemplo, una secuencia peptídica que contiene al menos un aminoácido) y/o un polímero sintético (por ejemplo, PEG) como se describe en el presente documento, de modo que la masa total de la variante de CNP se caracteriza por los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa. En una realización, los restos de Cys₆ a Cys₂₂ forman una parte cíclica. En una realización, (x) y/o (z) comprenden una prolongación de aminoácido obtenida a partir de un polipéptido de NPPC o un polipéptido que no es CNP (por ejemplo, ANP, BNP, IgG, etc.), en el que la prolongación contiene de 1 a 40, de 1 a 35, de 1 a 31, de 5 a 35, de 5 a 31 o de 5 a 15 aminoácidos. En otra realización, las variantes de CNP comprenden una o más modificaciones y/o acciones con otro aminoácido natural, un aminoácido no natural, un peptidomimético y/o un isoéster de enlace peptídico en una o más de las siguientes posiciones de CNP22: Gly₁, Lys₄, Gly₅, Cys₆, Phe₇, Gly₈, Leu₉, Lys₁₀, Leu₁₁, Ile₁₄, Gly₁₅, Ser₁₆, Met₁₇, Gly₁₉, Leu₂₀ y Gly₂₁.

En el presente documento se enseñan variantes de CNP que tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, diseñados para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP, se representan con la fórmula general:

(x)-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-(h)₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 141), o

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(b)₄-Gly₅-Cys₆-Phe₇-Gly₈-Leu₉-(h)₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 6), en la que:

(x) es un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es PEG (o PEO), y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos que contiene de 1 a 35 aminoácidos y que se obtiene a partir de NPPC o variantes del mismo con sustituciones y/o deleciones, ANP, BNP, u otros (poli) péptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, albúmina de suero, IgG, glicoproteínas ricas en histidina, fibronectina, fibrinógeno, polipéptidos que contienen dedos de cinc, osteocrina o factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2);

(z) puede estar ausente o puede ser un grupo polimérico sintético o natural, o una combinación de los mismos, en el que un ejemplo no limitante de un grupo polimérico sintético es PEG, y un ejemplo no limitante de un grupo polimérico natural es una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un polipéptido natriurético (por ejemplo, NPPC, CNP, ANP o BNP) o polipéptido no natriurético (por ejemplo, albúmina de

suelo o IgG); y

(b) y (h) pueden ser independientemente la Lys de tipo silvestre en esa posición no pueden estar sustituidos por una sustitución de aminoácido conservativa o cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser. En una realización, (b) es Arg. En otra realización, para un aumento de la resistencia a NEP, (b) no es Gly. En otra realización más, (h) no es Arg.

Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de NPPC o variantes del mismo incluyen:

Arg,
 Glu-Arg,
 Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 7),
 Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID NO: 8),
 Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (SEQ ID NO: 9),
 Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (SEQ ID NO: 10),
 Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (SEQ ID NO: 11),
 Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (SEQ ID NO: 12),
 Gly-Ala-Asn-Arg-Met (SEQ ID NO: 13),
 Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (SEQ ID NO: 14),
 Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (SEQ ID NO: 15),
 Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala (SEQ ID NO: 16),
 Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg (SEQ ID NO: 17),
 Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (SEQ ID NO: 18),
 Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 19),
 Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID NO: 20),
 Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-
 Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID NO: 21), y
 Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-
 Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID NO: 22).

Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de polipéptidos que no son CNP tales como, por ejemplo, ANP, BNP, albúmina de suero e IgG incluyen:

Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (SEQ ID NO: 23);
 Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 24);
 Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 25);
 Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26);
 Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (SEQ ID NO: 27);
 Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (SEQ ID NO: 28);
 Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (SEQ ID NO: 29);
 Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (SEQ ID NO: 30);
 Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (SEQ ID NO: 31);
 Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 32).

En una realización, el grupo N-terminal (x) y/o el grupo C-terminal (z) de cualquiera de las variantes de CNP que tienen un grupo (x) y/o (z), como se describe en el presente documento, comprenden independientemente una secuencia de aminoácidos que contiene un número pequeño de, si los hubiera, aminoácidos naturales o naturales ácidos (por ejemplo, Asp o Glu). En otra realización, (x) y/o (z) están enriquecidos en aminoácidos naturales o naturales básicos (por ejemplo, Lys, Arg o His) para mantener un pl alcalino similar al pl de CNP22 (pl 8,9). En una realización, el pl de las variantes de CNP está en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 10,5, diseñado de modo que las variantes de CNP se puedan difundir más fácilmente a través de la matriz extracelular que rodea los condrocitos de las placas de crecimiento óseo. En realizaciones menos amplias, el pl de las variantes de CNP es de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10,5, o de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 10.

En otra realización más, (x) y/o (z) están enriquecidos en aminoácidos naturales o naturales polares, diseñados para aumentar la solubilidad acuosa. Además, en otra realización, (x) y/o (z) contienen un número pequeño de, si los hubiera, aminoácidos naturales o naturales hidrófobos (por ejemplo, Ala, Val, Leu, Ile o Met).

El extremo N-terminal de una variante de CNP puede terminar en al menos un resto de glicina, diseñado para aumentar la semivida en suero. En una realización relacionada, para evitar la formación de piroglutamina, el extremo N-terminal de las variantes de CNP termina en un resto de glicina si pudiera de otro modo termina en glutamina. En una realización, el grupo (x) contiene una prolongación de aminoácido cuyo extremo N-terminal termina en al menos un resto de glicina. En otra realización, (x) y/o (z) no contienen dos aminoácidos naturales o naturales básicos

adyacentes (por ejemplo, Lys-Lys o Arg-Arg), diseñados para reducir la susceptibilidad a la escisión por la proteasa furina. En una realización, (x) no contiene dos aminoácidos básicos adyacentes que preceden inmediatamente a la posición que corresponde a la Gly1 de CNP22.

5 El grupo (x) y/o el grupo (z) de una variante de CNP pueden comprender una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de NPPC (por ejemplo, obtenida a partir de CNP53). En una realización, (x) comprende una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la cola N-terminal de ANP o BNP. En otra realización, (z) comprende una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la cola C-terminal de ANP o BNP. En una realización más, (x) y/o (z) comprenden una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de un polipéptido no natriurético tal como, por ejemplo,
10 IgG, albúmina de suero humano (HSA), glicoproteínas ricas en histidina, fibronectina, fibrinógeno, polipéptidos que contienen dedos de cinc, FGF-2, y proteínas de dirección a hueso (por ejemplo, osteocrina, osteopontina, osteocalcina, y sialoproteína).

15 En cualquier realización descrita en el presente documento en la que CNP22 o una variante del mismo pueda tener un grupo N-terminal (x) y/o un grupo C-terminal (z), (x) y/o (z) pueden contener independientemente una secuencia de aminoácidos obtenida a partir del dominio funcional de una proteína genética ósea (BMP). Una prolongación de aminoácido N-terminal y/o C-terminal obtenida a partir del dominio funcional de una BMP puede aumentar la resistencia a NEP, y por lo tanto la semivida en suero de la variante de CNP, aumentando la masa total de la variante de CNP que se caracteriza por los intervalos que se describen por lo general el presente documento, por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa. Además, dado que ciertas BMP son factores de crecimiento y citoquinas que inducen la formación de hueso y cartílago, un fragmento obtenido a partir del dominio funcional de una a BMP puede estimular el crecimiento de condrocitos, cartílago o hueso mediante un mecanismo distinto del de la activación de la función de la guanilil ciclasa de NPR-B por el dominio cíclico de CNP22 o una variante del mismo. Los ejemplos no limitantes de las BMP que estimulan la formación y desarrollo de hueso, formación y desarrollo de cartílago, y/o diferenciación de osteoblastos incluyen BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 y BMP8a. En una realización, el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o una variante del mismo están conjugados independientemente con una secuencia de aminoácidos obtenida a partir de los últimos 140 aminoácidos en la parte C-terminal de BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 o BMP8a.

30 Una variante de CNP puede contener una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o CNP17, que incluye, pero no se limita a:

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYK GANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-53) (SEQ ID NO: 4);
35 QEHPNARKYK GANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (CNP-37, Análogo BL) (SEQ ID NO: 60);
AAWARLLQEHPNAGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CA) (SEQ ID NO: 61);
AAWARLLQEHPNARGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CB) (SEQ ID NO: 62);
DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CC) (SEQ ID NO: 63);
RGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 40);
40 ERGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 38);
GANQQGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 64);
GANRRGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 65);
GANPRGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 66);
GANSSGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 67);
45 GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 144); y
SPKMVQSG-CNP17-KVLR RH (Análogo CD) (CNP17 que tiene colas N-terminales y C-terminales obtenido a partir de BNP) (SEQ ID NO: 68).

Las variantes de CNP pueden tener una sustitución de K4R en la posición 4 de CNP22. Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP(K4R) incluyen:

50 GANRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo AY) (SEQ ID NO: 36);
GANPRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CI) (SEQ ID NO: 37);
RGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo AZ) (SEQ ID NO: 41);
ERGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo BA) (SEQ ID NO: 39);
55 GANQQGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CH) (SEQ ID NO: 69); y
GANSSGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Análogo CG) (SEQ ID NO: 70).

Las variantes de CNP pueden ser quimeras que comprenden CNP22 o una variante del mismo que tienen adición o adiciones, delección o delecciones y/o sustitución o sustituciones de aminoácido, y un fragmento de péptido obtenido a partir de un polipéptido o proteína distinta de CNP, o todo el polipéptido o proteína que no es CNP, con respecto al extremo N-terminal del péptido CNP, en el que CNP22 o la variante del mismo puede tener opcionalmente una prolongación de aminoácido N-terminal de uno o más restos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, las quimeras de CNP comprenden CNP22 o una variante del mismo que quien una prolongación de aminoácido N-terminal de uno o más restos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, las quimeras de CNP contienen restos de lisina-lisina (KK) o restos de GANKK que preceden inmediatamente a la primera posición de CNP22 (Gly en el caso de CNP22) o una variante del mismo. En otras realizaciones, las quimeras de CNP contienen uno o dos restos diferentes de la lisina-

lisina que precede inmediatamente la primera posición de CNP22 o una variante del mismo. Los ejemplos no limitantes de restos que pueden preceder inmediatamente la primera posición de CNP22 o una variante del mismo incluyen KP, PK, PR, PQ, QK, QQ, RR, SS, GANKP (SEQ ID NO: 200), GANPK (SEQ ID NO: 201), GANPR (SEQ ID NO: 9), GANPQ (SEQ ID NO: 202), GANQK (SEQ ID NO: 203), GANQQ (SEQ ID NO: 10), GANRR (SEQ ID NO: 8), y GANSS (SEQ ID NO: 11).

Las variantes de CNP pueden ser quimeras que comprenden CNP22 y un fragmento de péptido N-terminal, que incluyen, pero no se limitan a:

- 10 GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CQ) (quimera de fragmento de glicoproteína rica en histidina (HRGP)-CNP22) (SEQ ID NO: 76);
- GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CR) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID NO: 77);
- 15 GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CX) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID NO: 78);
- GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CF) (quimera de fragmento de IgG1(Fc)-CNP22) (SEQ ID NO: 79);
- GQHKDDNPNLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CY) (quimera de fragmento de albúmina de suero humano (HSA)-CNP22) (SEQ ID NO: 80);
- 20 GERAFAKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CE) (quimera de fragmento de HSA-CNP22) (SEQ ID NO: 81);
- FGIPMDRIGRNPRGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CZ) (quimera de fragmento de "inhibidor de NPR-C" de osteocrina-CNP22) (SEQ ID NO: 82); y
- 25 GKRTGQYKLGSKTGP GPKLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo DA) (quimera de fragmento de "dominio de unión a heparina" de FGF2-CNP22) (SEQ ID NO: 83).

Las variantes de CNP son quimeras que comprenden un fragmento de péptido N-terminal y CNP22 en las que la arginina está sustituida por la Lys4 de CNP22 ("CNP22(K4R)"), que incluyen, pero no se limitan a:

- 30 GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CK) (quimera de fragmento de IgG1(Fc)-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 84);
- GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CL) (quimera de fragmento de HSA-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 85);
- 35 GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CM) (quimera de fragmento de fibronectina-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 86);
- GQTHSSGTQSGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CN) (quimera de fragmento de fibrinógeno-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 87);
- GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CO) (quimera de fragmento de fibrinógeno-CNP22(K4R)) (SEQ ID NO: 88); y
- 40 GSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRI GMSGLGC (Análogo CP) (quimera de fragmento de dedos de cinc-CNP22) (SEQ ID NO: 89).

Las quimeras que comprenden IgG y CNP22 o una variante de los mismos se diseñan para, entre otros, a aumentar la resistencia a la degradación de NEP y reducir la unión a albúmina de suero. Las quimeras de CNP que comprenden un fragmento de superficie de HSA se diseñan para, entre otros, reducir la inmunogenicidad y reducir la unión a albúmina de suero. Las quimeras de HRGP-CNP22 y HRGP-CNP22(K4R) que contienen una secuencia que no es arginina, que no es lisina, rica en histidina, catiónica en el extremo N-terminal se diseñan para, entre otros, aumentar la estabilidad a proteasas. Las quimeras que contienen un fragmento de osteocrina se diseñan para que liberen, después de escisión con proteasa (por ejemplo, furina), el fragmento de osteocrina en las placas de crecimiento óseo, en las que el fragmento podría inhibir la eliminación del receptor NPR-C. Con respecto a las quimeras que comprenden un fragmento de unión a heparina de FGF2, la heparina que se une al fragmento se diseña para proteger la quimera de la degradación, proporcionando de ese modo una semivida en suero más larga. Las quimeras que contienen un fragmento de fibronectina, fibrinógeno, o dedos de cinc se diseñan para reducir la unión a albúmina de suero, entre otras características.

Sin pretender quedar ligado por la teoría, una variante de CNP de un peso molecular de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa que tiene un aumento de la resistencia a la degradación de NEP y tiene una funcionalidad similar o mayor (por ejemplo, unión a NPR-B y estimulación de la señalización de cGMP) tal como en comparación con wtCNP22, puede ser más eficaz si no se une estrechamente a proteínas plasmáticas tales como albúmina de suero. Una variante de CNP que no se une estrechamente a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina de suero) puede ser más eficaz en la difusión a través del cartílago, llegando a los condrocitos de las placas de crecimiento óseo, y en la unión y en la activación de la NPR-B para la señalización de cGMP. Las variantes de CNP diseñadas para reducción de la unión a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina de suero) son quimeras que comprenden CNP22 o una variante del mismo y un fragmento peptídico de IgG. Otras variantes de CNP diseñadas para reducir la unión a proteínas plasmáticas son quimeras que comprenden CNP22 o CNP22(K4R) y un fragmento de un polipéptido (por ejemplo, IgG, HSA, fibronectina, fibrinógeno, un polipéptido que

contiene dedos de cinc, etc.). Además, otras variantes de CNP diseñadas para reducir la unión a proteínas plasmáticas comprenden CNP22 o una variante del mismo conjugada a un polímero hidrófilo o soluble en agua. El polímero hidrófilo o soluble en agua puede ser PEG (o PEO). El polímero hidrófilo o soluble en agua (por ejemplo, PEG) se puede funcionalizar con uno o más grupos funcionales que transmiten una carga negativa al polímero en condiciones fisiológicas, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo, sulfato o fosfato, o una combinación de los mismos.

Las variantes de CNP pueden incluir péptidos CNP truncados que varían del CNP-17 humano (hCNP-17) al CNP-53 humano (hCNP-53), y que tienen secuencias de aminoácidos de tipo silvestre obtenidas a partir de hCNP-53. Tales péptidos CNP truncados incluyen:

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-53) (SEQ ID NO: 4);
 LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-52) (SEQ ID NO: 146);
 RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-51) (SEQ ID NO: 147);
 VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-50) (SEQ ID NO: 148);
 DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-49) (SEQ ID NO: 149);
 TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-48) (SEQ ID NO: 150);
 KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-47) (SEQ ID NO: 151);
 SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-46) (SEQ ID NO: 152);
 RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-45) (SEQ ID NO: 153);
 AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-44) (SEQ ID NO: 154);
 AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-43) (SEQ ID NO: 155);
 WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-42) (SEQ ID NO: 156);
 ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 157);
 RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-40) (SEQ ID NO: 158);
 LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID NO: 159);
 LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 160);
 QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-37) (SEQ ID NO: 160);
 EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-36) (SEQ ID NO: 161);
 HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-35) (SEQ ID NO: 162);
 PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-34) (SEQ ID NO: 163);
 NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-33) (SEQ ID NO: 164);
 ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-32) (SEQ ID NO: 165);
 RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-31) (SEQ ID NO: 166);
 KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-30) (SEQ ID NO: 167);
 YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-29) (SEQ ID NO: 168);
 KGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-28) (SEQ ID NO: 169);
 GANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-27) (SEQ ID NO: 170);
 ANKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-26) (SEQ ID NO: 171);
 NKKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-25) (SEQ ID NO: 172);
 KKGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-24) (SEQ ID NO: 173);
 KGLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-23) (SEQ ID NO: 174);
 GLSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-22) (SEQ ID NO: 1);
 LSKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-21) (SEQ ID NO: 175);
 SKGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-20) (SEQ ID NO: 176);
 KGCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-19) (SEQ ID NO: 177);
 GCFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-18) (SEQ ID NO: 178); y
 CFGLKLDRIIGMSGLGC (CNP-17) (SEQ ID NO: 2).

En ciertas realizaciones, las variantes de CNP no incluyen CNP-17, CNP-22 o CNP-53.

Los péptidos CNP truncados que varían de hCNP-17 a hCNP-53 pueden contener adición(s), delección(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos con aminoácido(s) o peptidomimético(s) naturales o no naturales (por ejemplo, isoéster(es) de enlace peptídico), como se describe en el presente documento, en una cualquiera o más de las posiciones del aminoácido de los péptidos CNP truncados en particular. En otra realización más, los péptidos CNP truncados que tienen secuencias de tipo silvestre o adición(s), delección(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos, se pueden conjugar en el extremo N-terminal, C-terminal, y/o un sitio interno con cualquiera de los restos que se describen en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, restos de dirección a hueso o cartílago (por ejemplo, bisfosfonatos, secuencias peptídicas de dirección a hueso o cartílago (por ejemplo, poliAsp, poliGlu), secuencias peptídicas obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas (por ejemplo, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína)), secuencias peptídicas obtenidas a partir de los dominios funcionales de proteínas morfogénicas óseas (por ejemplo, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7, BMP8a), secuencias peptídicas obtenidas a partir de polipéptidos natriuréticos (por ejemplo, NPPC, ANP, BNP), secuencias peptídicas obtenidas a partir de polipéptidos de origen no natriurético (por ejemplo, albúmina de suero, IgG, glicoproteínas ricas en histidina, fibronectina, fibrinógeno, polipéptidos que contienen dedos de cinc, FGF-2, osteocrina), restos que reducen la eliminación renal (por ejemplo, restos de PEG con carga negativa), polímeros hidrófilos (por ejemplo, PEG),

carbohidratos (por ejemplo, carbohidratos reconocidos por receptores en la superficie de las células en las placas de crecimiento óseo), ácidos hidrófobos (por ejemplo, ácidos carboxílicos C₅-C₁₂, ácidos grasos naturales), fosfolípidos, y combinaciones de los mismos. En una realización, los péptidos CNP truncados que tienen secuencias de tipo silvestre o adición(s), deleción(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos, y que están opcionalmente conjugados con uno o más restos en el extremo N-terminal, C-terminal, y/o un sitio interno, tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa.

Las variantes de CNP pueden ser derivados de CNP37, que es QEHPNARKYKGANKK-CNP22 (SEQ ID NO: 60). Las variantes de CNP37 pueden contener adición(s), deleción(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos con aminoácido(s) o peptidomimético(s) naturales o no naturales (por ejemplo, isoéster(es) de enlace peptídico) en una cualquiera o más de las 37 posiciones de CNP37. Los ejemplos no limitantes de sustituciones que se pueden realizar en CNP37, basándose en la numeración de CNP22, incluyen K4R, G5S, G5R, G8S, K11R, G15S, S16Q, M17N, G19R, y combinaciones de los mismos. En una realización, los derivados de CNP37 contienen una sustitución de Met17 por un aminoácido o peptidomimético natural (por ejemplo, asparagina) o no natural, diseñado en parte para evitar la oxidación del átomo de azufre de la metionina. En otra realización, las variantes de CNP37 contienen sustitución o sustituciones de Lys8, Lys10, Lys14 y/o Lys15 (basándose en la numeración desde el extremo N-terminal de CNP37) a aminoácido(s) o peptidomimético(s) naturales o no naturales no básicos, diseñados en parte para reducir la unión a albúmina.

Además o como alternativa a la adición(s), deleción(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos, los derivados de CNP37 se pueden conjugar en el extremo N-terminal, C-terminal, y/o un sitio interno a cualquiera de los restos que se describen en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, restos de dirección a hueso o cartílago (por ejemplo, dominio específicos de dirección a hueso), restos que reducen la eliminación renal (por ejemplo, restos de PEG con carga negativa), polímeros hidrófilos (por ejemplo, PEG), secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más aminoácidos (por ejemplo, fragmento de "inhibidor de NPR C" de osteocrina), carbohidratos (por ejemplo, carbohidratos reconocidos por receptores en la superficie de las células en las placas de crecimiento óseo), ácidos hidrófobos (por ejemplo, ácidos carboxílicos C₅-C₁₂ y ácidos grasos naturales), y combinaciones de los mismos.

Las variantes de CNP pueden ser péptidos modificados con CNP37 que tienen mutación o mutaciones/sustitución o sustituciones en el sitio de escisión de furina (subrayado), diseñadas para aumentar la resistencia *in vivo* a la proteasa de furina, y/o que contienen glicina (subrayado) en el extremo N-terminal, diseñadas para aumentar la estabilidad en plasma y para prevenir la formación de piroglutamina. Tales variantes de CNP37 incluyen, pero no se limitan a:

- QQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (An. CS) (SEQ ID NO: 71);
- QQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (An. CT) (SEQ ID NO: 72);
- QQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (An. CU) (SEQ ID NO: 73);
- QQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (An. CW) (SEQ ID NO: 74);
- QQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Gly-CNP37, An. DB) (SEQ ID NO: 75); y
- PQQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145).

Las variantes de CNP pueden incluir péptidos CNP y variantes de los mismos que se pueden producir con el proceso de proteína de fusión que se describe en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP que se pueden producir con el proceso de proteína de fusión que se describe en el presente documento, usando escisión química o proteolítica o aunque escisión de proteínas, incluyen:

- GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Gly-wtCNP53) (SEQ ID NO: 179);
- QEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Gly-wtCNP37) (SEQ ID NO: 75);
- QEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (wtCNP37) (SEQ ID NO: 60);
- GHKSEVAHRFK-GANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (fragmento de HSA-wtCNP27) (SEQ ID NO: 144);
- GANRRGLSRGCFGLKLDRI^SMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (SEQ ID NO: 36);
- DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SNSGLGC [CNP53(M48N)] (SEQ ID NO: 180);
- QGEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 181);
- QEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SNSGLGC [CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 182);
- GHKSEVAHRFK-GANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (SEQ ID NO: 183);
- GANRRGLSRGCFGLKLDRI^SNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (SEQ ID NO: 184);
- PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Pro-wtCNP53) (SEQ ID NO: 185);
- PGQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Pro-Gly-wtCNP37) (SEQ ID NO: 145);
- PQEHPNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Pro-wtCNP37) (SEQ ID NO: 186);
- PNARKYKGANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (wtCNP34) (SEQ ID NO: 187);
- P-GHKSEVAHRFK-GANKKGGLSKGCFGLKLDRI^SMSGLGC (Pro-HSA-wtCNP27) (SEQ ID NO: 188);
- PGANRRGLSRGCFGLKLDRI^SMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)] (SEQ ID NO: 189);

MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-wtCNP53) (SEQ ID NO: 190);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-Gly-wtCNP37) (SEQ ID NO: 191);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-wtCNP37) (SEQ ID NO: 192);

5 M-GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC (Met-HSA-wtCNP27) (SEQ ID NO: 193);

MGANRRGLSRGCFGLKLD RIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)] (SEQ ID NO: 194).

10 Otras variantes de CNP, que incluyen péptidos CNP truncados que varían de hCNP-17 a hCNP-53 y que tienen secuencias de tipo silvestre o adición(s), delección(s) y/o sustitución(s) de aminoácidos, también se traen producir con el proceso de proteína de fusión que se describe en el presente documento, siempre y cuando el sitio pretendido de escisión química o proteolítica de la proteína de fusión no esté presente dentro de la secuencia de aminoácidos de la propia variante de CNP diana. Como un ejemplo no limitante, el proceso de proteína de fusión que se describe en el presente documento se puede usar para producir wtCNP34 truncado usando escisión con ácido fórmico.

15 En realizaciones adicionales, para cualquiera de los péptidos CNP y variantes de CNP que se describen en el presente documento que tienen resto o restos de asparagina (Asn/N) y/o resto o restos de glutamina (Gln/Q), tanto si tienen una secuencia de tipo silvestre como una secuencia de aminoácido no natural, cualquier resto o restos de Asn y/o cualquier resto o restos de Gln se puede sustituir independientemente con cualquier otro aminoácido natural o no natural, incluyendo sustituciones conservativas tales como de Asn a Gln. Tal sustitución o sustituciones se diseñan en parte para minimizar o para evitar cualquier potencial desamidación potencial de asparagina y/o glutamina. Los ejemplos no limitantes de péptidos CNP y variantes en los que cualquier resto o restos de Asn y/o cualquier resto o restos de Gln se puede sustituir independientemente con cualquier otro aminoácido natural o no natural, incluyendo sustituciones conservativas tales como de Asn a Gln, incluyen wtCNP34, wtCNP37, Gly-wtCNP37, Pro-wtCNP37, Pro-Gly-wtCNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (SEQ ID NO: 144), Pro-GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (SEQ ID NO: 188), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36). En ciertas realizaciones, un resto de asparagina de los péptidos CNP y variantes de CNP que se describen en el presente documento no está sustituido con glutamina, ácido aspártico o ácido glutámico. En ciertas realizaciones, un resto de glutamina de los péptidos CNP y variantes de CNP que se describen en el presente documento no está sustituido con asparagina, ácido aspártico o ácido glutámico. Como un ejemplo no limitante, los restos 7 y/o 15 de asparagina de Pro-Gly-wtCNP37 (PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 145) pueden estar sustituidos independientemente con cualquier otro aminoácido natural o no natural, incluyendo glutamina, para evitar cualquier desamidación potencial del resto o restos de asparagina a ácido aspártico o ácido isoaspártico. En ciertas realizaciones, los restos 7 y/o 15 de asparagina de Pro-Gly-wtCNP37 no están sustituidos con glutamina, ácido aspártico o ácido glutámico.

35 Sin embargo, se entiende que la presente divulgación incluye variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos susceptibles a la desamidación o una reacción similar a una desamidación (por ejemplo, isomerización) se pueden convertir en otro resto o restos a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación en cualquier medida, hasta un 100 % de conversión por resto convertido. En ciertas realizaciones, la divulgación incluye variantes de CNP en las que:

- 40 (1) uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina (Asn/N) se pueden convertir en ácido aspártico o aspartato, y/o en ácido isoaspártico o isoaspartato, a través de desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido; o
- 45 (2) uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de glutamina (Gln/Q) se pueden convertir en ácido glutámico o glutamato, y/o en ácido isoglutámico o isoglutamato, a través de desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido; o
- (3) uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de ácido aspártico o aspartato (Asp/D) se pueden convertir en ácido isoaspártico o isoaspartato a través de una reacción similar a la desamidación (también denominada isomerización) hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido; o
- 50 (4) uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de ácido glutámico o glutamato (Glu/E) se pueden convertir en ácido isoglutámico o isoglutamato a través de una reacción similar a la desamidación (también denominada isomerización) hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido; o
- 55 (5) una combinación de lo mencionado anteriormente.

60 En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico de Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC] (SEQ ID NO: 145) se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido glutámico/glutamato y/o ácido isoglutámico/isoglutamato, (3) ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (4) ácido isoglutámico/isoglutamato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido, como se ha descrito anteriormente.

65

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina y/o ácido aspártico de Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD^{DRIGSMSGLGC}] (SEQ ID NO: 145) se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (2) ácido isoaspártico/isoaspartato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico de Gly-wtCNP37 [GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD^{DRIGSMSGLGC}] (SEQ ID NO: 75)] se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido glutámico/glutamato y/o ácido isoglutámico/isoglutamato, (3) ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (4) ácido isoglutámico/isoglutamato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico de wtCNP37 [QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLD^{DRIGSMSGLGC}] (SEQ ID NO: 60)] se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido glutámico/glutamato y/o ácido isoglutámico/isoglutamato, (3) ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (4) ácido isoglutámico/isoglutamato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico de una quimera de HSA-wtCNP27, GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLD^{DRIGSMSGLGC}] (SEQ ID NO: 144), se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (3) ácido isoglutámico/isoglutamato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de asparagina, ácido aspártico, y/o ácido glutámico de una quimera de Pro-HSA-wtCNP27, PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLD^{DRIGSMSGLGC}] (SEQ ID NO: 188), se pueden convertir en (1) ácido aspártico/aspartato y/o ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido isoaspártico/isoaspartato, y/o (3) ácido isoglutámico/isoglutamato, respectivamente, a través de desamidación o una reacción similar a una desamidación hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de conversión por resto convertido.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP en las que uno cualquiera o más, hasta todos, los restos de metionina (Met/M) se pueden oxidar a una forma oxidada químicamente factible (por ejemplo, sulfóxido y/o sulfona) hasta aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 100 % de transformación por resto oxidado.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP que comprenden CNP22 o variantes del mismo conjugados en el extremo N-terminal y/o C-terminal a resto o restos que facilitan la translocación de las variantes a través de una membrana celular o barrera celular. En una realización, las variantes de CNP se conjugan en el extremo N-terminal y/o C-terminal con secuencia o secuencias peptídicas que facilitan el transporte de las variantes a través de una membrana celular o barrera celular, incluyendo través de transportadores de péptidos activos.

El extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o una variante del mismo se puede conjugar con restos químicos tales como, por ejemplo, polímeros naturales y/o sintéticos, para aumentar la masa total del péptido CNP modificado con respecto a los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa. En una realización, los restos químicos son polímeros naturales hidrófilos o solubles en agua (por ejemplo, péptidos, carbohidratos) o sintéticos (por ejemplo, PEG (o PEO)) biocompatibles.

El extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o una variante del mismo se puede conjugar con polímeros de PEG (o PEO) para dar como resultado una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa. La pegilación de CNP22 o una variante del mismo se diseñan, entre otros, para reducir la inmunogenicidad y para mejorar la semivida mediante la reducción de la eliminación renal y el aumento de la resistencia a proteasas. Un resto de PEG se puede unir al extremo N- y/o C-terminal de CNP22 o cualquier variante que se describe en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, CNP-17 (la porción ciclada de Cys6-Cys22 de CNP22), CNP37, y variantes de CNP17, CNP22 o CNP37 que tengan prolongación o prolongaciones de aminoácido N- y/o C-terminal, sustitución o sustituciones de aminoácido (s) y/o delección o delecciones de aminoácido. En una realización,

los restos Lys4 y/o Lys10 de CNP17, CNP22 o CNP37, o variantes de los mismos, están sustituidos con un aminoácido natural o no natural (por ejemplo, Arg, Gly, Ser, Gln, Glu o Cit) o peptidomimético que no contiene una amina primaria reactiva en una cadena lateral, para excluir cualquier PEGilación potencial de estos restos de lisina. En una realización, los restos Lys4 y/o Lys10 de los péptidos CNP están sustituidos con Arg. En otra realización, el resto Lys10 no está sustituido con Arg.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP (incluyendo CNP22 y variantes del mismo) que tienen un resto PEG (o PEO) y una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal contienen arginina en la posición que precede inmediatamente a la posición que corresponde a Gly1 de CNP22. Tales variantes de CNP PEGilado se diseñan para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP, reducción de la unión a albúmina de suero, y aumento de la actividad funcional de CNP (por ejemplo, activación de la señalización de cGMP). Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP PEGilado incluyen PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), PEO24-GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 36), PEO12-GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 36), PEO24-GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), PEO12-GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), PEO24-GANPR-CNP22 (SEQ ID NO: 37), PEO12-GANPR-CNP22 (SEQ ID NO: 37), PEO24-GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64), PEO12-GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64), PEO24-ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39), PEO12-ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39), PEO24-ER-CNP22 (SEQ ID NO: 39), PEO12-ER-CNP22 (SEQ ID NO: 39), PEO24-R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), PEO12-R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), PEO24-R-CNP22 (SEQ ID NO: 41), and PEO12-R-CNP22 (SEQ ID NO: 41), en los que PEO24 es un polímero de PEG de 1,2 kDa monodisperso y PEO12 es un polímero de PEG de 0,6 kDa monodisperso. En una realización, el polímero de PEG (o PEO) está conjugado con el extremo N-terminal de las variantes de CNP.

La divulgación contempla el uso de polímeros hidrófilos o solubles en agua (por ejemplo, PEG) que pueden variar en su tipo (por ejemplo, homopolímero o copolímero; copolímero aleatorio, alternante o de bloque; lineal o ramificado; monodisperso o polidisperso), unión (por ejemplo, unión hidrolizable o es tan letal como, por ejemplo, enlace de amida, imina, aminal, alquileo, o éster), sitio de conjugación (por ejemplo, en el extremo N-terminal y/o C-terminal, preferentemente no en cualquiera de los restos en la región ciclada de CNP (que corresponde a los restos 6-22 de CNP22)), y longitud (por ejemplo, de aproximadamente 0,2, 0,4 o 0,6 kDa a aproximadamente 2, 3, 4 o 5 kDa). El polímero hidrófilo o soluble en agua se puede conjugar con el péptido CNP por medio de química basada en N-hidroxisuccinimida (NHS) o aldehído o cualquier otra química, como se sabe en la técnica. Tales variantes de CNP se pueden generar usando, por ejemplo, wtCNP22 (2,2 kDa), CNP17 que retiene solamente la región ciclada (restos 6-22) de wtCNP22, variantes de CNP que tienen una prolongación de aminoácido en el extremo N-terminal y/o C-terminal de CNP22 o CNP17, o variantes que tienen sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácido, tales como, por ejemplo, GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), GANPR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 37), R-CNP22 (SEQ ID NO: 40), R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41), ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38) y ER-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 39). En una realización, las variantes de PEG-CNP que tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, contienen un resto de PEG (o PEO) lineal, monodisperso conjugado en el extremo N-terminal y/o C-terminal a través de química basada en NHS o aldehído, o un resto de PEG ramificado con dos ramas o tres ramas conjugado en el extremo N-terminal y/o C-terminal a través de química basada en NHS. La divulgación también incluye variantes con carga negativa de PEG-CNP diseñadas para reducir la eliminación renal, que incluyen, pero no se limitan a, 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'*, 22: 127-135 (1982)). En una realización, el resto de PEG (o PEO) contiene grupo o grupos carboxilo, grupo o grupos sulfato, y/o grupo o grupos fosfato.

En otra realización, los restos de PEG (o PEO) conjugados con el extremo N-terminal, C-terminal y/o sitio o sitios internos de las variantes de CNP que se describen en el presente documento contienen uno o más grupos funcionales que tienen carga positiva en condiciones fisiológicas. Tales restos de PEG se diseñan, entre otros, para aumentar la distribución de tales variantes de CNP PEGilado a tejidos de cartílago. En una realización, tales restos de PEG contienen uno o más grupos amino primario, secundario o terciario, grupos amonio cuaternario, y/u otros grupos que contienen amina (por ejemplo, urea).

En el presente documento se enseñan el CNP22 o variantes del mismo conjugados a través de química basada en NHS o aldehído a PEG (r PEO) de fórmula $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, en la que n es un número entero de aproximadamente 6 a aproximadamente 100, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,3 kDa a aproximadamente 5 kDa. En otra realización, n es un número entero de aproximadamente 12 a aproximadamente 50, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 2,5 kDa. En otra realización más, n es de aproximadamente 12 a aproximadamente 24, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 1,2 kDa. Además, en otra realización, el grupo hidroxilo terminal del polímero de PEG está protegido con un grupo no reactivo. En una realización particular, el grupo de protección terminal es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo inferior tal como metilo.

En el presente documento se enseñan las variantes de CNP que tienen uno o más enlaces peptídicos o isoésteres de enlace peptídico que tienen una reducción de la susceptibilidad a la escisión con peptidasas que incluyen endopeptidasa neutra (NEP). La NEP es una endopeptidasa dependiente de cinc unida a membrana que escinde un

enlace peptídico de sustrato en el extremo amino de restos hidrófobos grandes. Por lo tanto, la modificación de un enlace peptídico en un sitio de escisión por NEP a un enlace peptídico o no peptídico natural puede excluir o disminuir la eficacia de la escisión con NEP.

5 Para ANP y CNP, se informa que la escisión con NEP se produce en primer lugar en el enlace Cys6-Phe7 dentro de la región ciclada, a continuación en cualquier parte a través del resto de las estructuras. Para BNP, se informa que la escisión se produce en primer lugar en el extremo N-terminal del péptido, y a continuación dentro de la estructura cíclica. Aunque se informa que el sitio de escisión con NEP primario en CNP es el enlace Cys6-Phe7, cuando wtCNP22 se expuso a la digestión con NEP durante 2,5 minutos *in vitro*, todos los sitios posibles se hidrolizaron de forma inesperada, con los enlaces peptídicos Cys6-Phe7 y Gly8-Leu9 siendo ligeramente los más lábiles, como se describe en el Ejemplo 2.

15 La especificidad de sustrato de NEP se determina principalmente con dos subsitios de unión al sustrato, S1' y S2' (Oefner *et al.*, J. Mol. Biol. 296: 341-349 (2000)). El sitio S1' acepta un resto de P1' hidrófobo grande del cual el enlace peptídico N-terminal se somete a hidrólisis (por ejemplo, Phe, Leu, Ile y Met). El sitio S2' por lo general prefiere un resto más pequeño, denominado P2' (por ejemplo, Gly o Ser). En el caso de CNP, se informa que Phe7 es el resto de P1' preferente para el sitio S1' de NEP, mientras que Gly8 es el resto P2' preferente para el sitio the S2'. Dado que estos dos subsitios pueden acomodar en conjunto solamente un cierto tamaño de cadena lateral total, cualquier aumento en el tamaño total de los restos P1'-P2' de CNP c puede interrumpir de forma potencial la unión a NEP. Por ejemplo, la adición de un átomo de cloruro en la posición 3 del anillo aromático Phe7 de P1' (es decir, 3-Cl-Phe7) puede modificar de forma potencial (por ejemplo, desestabilizar) interacciones entre CNP y los sitios de escisión con NEP, por ejemplo en el subsitio S1'. La adición de un grupo butilo terciario al resto Gly8 de P2' más pequeño (es decir, tBu-Gly8) puede interrumpir potencialmente la interacción entre CNP y el subsitio S2'.

25 Se enseña que las variantes de CNP que incluyen CNP que tienen un aumento del tamaño de los restos P1'-P2', tales como Phe7-Gly8, interfieren con el reconocimiento de sustrato en el sitio activo, reduciendo de ese modo la susceptibilidad a la escisión con NEP. Los restos de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales y/o peptidomimético se sustituyen por uno o más restos hidrófobos P1' grandes, que incluyen, pero no se limitan a, Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 y Leu20, y/o f por uno o más restos P2' más pequeños, que incluyen, pero no se limitan a, Cys6, Gly8, Gly15, Ser16 y Gly19.

35 En el presente documento se enseñan las variantes de CNP que comprenden al menos un aminoácido modificado y/o al menos un enlace peptídico modificado, en al menos un resto implicado en el reconocimiento de sustrato y/o escisión con NEP, en las que los aminoácidos modificados y los enlaces peptídicos modificados pueden ser aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, peptidomiméticos y/o isoésteres de enlace peptídico. En una realización, el sitio de escisión con NEP en CNP entre Cys6 y Phe7 está modificado. En una realización relacionada, el enlace peptídico (-C(=O)-NH-) entre Cys6 y Phe7 está sustituido con uno de los siguientes isoésteres de enlace peptídico:

40 -CH₂-NH-,
-C(=O)-N(R)-, en el que el grupo amida está alquilado con cualquiera de los siguientes grupos R: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo,
-C(=O)-NH-CH₂-,
-CH₂-S-,
45 -CH₂-S(O)_n-, en el que n es 1 o 2,
-CH₂-CH₂-,
-CH=CH-,
-C(=O)-CH₂-,
-CH(CN)-NH-,
50 -CH(OH)-CH₂-,
-O-C(=O)-NH-, o
-NHC(=O)NH-.

55 En otra realización, las variantes de CNP se representan con la fórmula:

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-Lys₄-Gly₅-(b)₆-(c)₇-(d)₈-Leu₉-Lys₁₀-Leu₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-Ile₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-Met₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-Leu₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 90), en la que:

60 (x) y (z) independientemente pueden estar ausente o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso o cartílago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas tales como o, por ejemplo, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína (Wang *et al.*, Adv. Drug Delivery Rev., 57: 1049-76 (2005)); moléculas poliméricas y no poliméricas que reducen la eliminación renal tales como, por ejemplo, los PEG con carga negativa; y polímeros naturales (por ejemplo, los que contienen aminoácidos, ácidos grasos y/o carbohidratos) y polímeros sintéticos (por ejemplo, los PEG) que aumentan la resistencia de la variante de

CNP a la degradación con NEP aumentando la masa total de la variante de CNP a los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa;

5 (b) y (c) pueden ser Cys6 y Phe7 de tipo silvestre, otro aminoácido natural o un aminoácido no natural, o puede contener un isoéster de enlace peptídico como se describe en el presente documento para aumentar la resistencia a la escisión con NEP; y

10 (d) puede ser Gly8 de tipo silvestre, o puede ser un aminoácido o peptidomimético natural o no natural (por ejemplo, t-Bu-Gly) de mayor tamaño para reducir la unión a NEP.

En una realización, tales variantes de CNP contienen al menos un aminoácido modificado en (b), (c) y/o (d).

15 Otros enlaces peptídicos dentro de CNP se pueden escindir incluso si CNP22 o una variante del mismo tiene un enlace peptídico o isoésteres de enlace peptídico resistentes a NEP en Cys6-Phe7, incluyendo los enlaces Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17, y Gly19-Leu20. Por lo tanto, la divulgación incluye variantes de CNP que tienen isoéster(es) de enlace peptídico en uno u otros sitios de escisión con NEP más además del enlace Cys6-Phe7, en las que los the isoésteres de enlace peptídico incluyen los que se describen en el presente documento.

20 En el presente documento se enseñan las variantes de CNP que tienen un análogo de cisteína en Cys6 y/o Cys22, que incluye, pero no se limita a, homocisteína, penicilamina, ácido 2-mercaptopropiónico, y ácido 3-mercaptopropiónico. En una realización, tales variantes de CNP tienen un dominio cíclico formado por un enlace disulfuro entre Cys6 o análogo y Cys22 o análogo de tipo silvestre.

25 Uno o más restos de CNP22 o una variante del mismo, hasta todos los restos, pueden estar sustituidos con un D-aminoácido. La sustitución de un L-aminoácido con un D-aminoácido esencialmente mueve la cadena lateral aproximadamente 120 grados desde su posición original, interrumpiendo potencialmente de ese modo la unión del péptido CNP a NEP. En una realización específica, L-Phe en Phe7 está sustituido con su enantiómero D, D-Phe.

30 Un beta aminoácido tal como, por ejemplo, ácido 3-amino-2-fenilpropiónico (o 2-fenil-beta-alanina), puede sustituir al alfa- aminoácido Phe7 de tipo silvestre. El uso de un beta-aminoácido aumenta de forma eficaz la longitud de la estructura principal peptídica con una unidad de metileno. La resistencia a proteasas puede resultar del cambio en la conformación del sustrato o el aumento de la distancia entre cadenas laterales de aminoácidos.

35 Los ejemplos no limitantes de variantes de CNP22 que tienen un alfa-aminoácido, un beta-aminoácido o un isoéster de enlace peptídico no naturales incluyen:

40 GLSKGC(CH₂NH)FGLKLDRI GSMSGLGC (Análogo A) (SEQ ID NO: 56),
 GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRI GSMSGLGC (Análogo B) (SEQ ID NO: 57),
 GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRI GSMSGLGC (Análogo E) (SEQ ID NO: 136),
 GLSKGCF-(tBu-Gly)-LKLDRIGSMSGLGC (Análogo F) (SEQ ID NO: 58),
 GLSKGC-(3-Cl-Phe)-GLKLDRI GSMSGLGC (Análogo G) (SEQ ID NO: 137), y
 GLSKGC-[NHCH₂CH(Ph)CO]-GLKLDRI GSMSGLGC (Análogo H, formado usando ácido 3-amino-2-
 45 fenilpropiónico) (SEQ ID NO: 59).

Las variantes de CNP tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, diseñados para un aumento de la resistencia a la degradación de NEP, y se representan con la fórmula:

50 (x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(a)₄-Gly₅-(b)₆-(c)₇-(d)₈-(e)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-Gly₁₅-Ser₁₆-(i)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(j)₂₀-Gly₂₁-
 Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 46), en la que:

55 (x) y (z) independientemente pueden estar ausentes o se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso o cartílago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas tales como, por ejemplo, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína; restos poliméricos y no poliméricos que reducen la eliminación renal tales como, por ejemplo, los PEG con carga negativa; polímeros que contienen, por ejemplo, aminoácidos, ácidos hidrófobos, y/o carbohidratos; y polímeros hidrófilos sintéticos tales como, por ejemplo, los PEG;

60 (a) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (a) es Arg;

65

(b) se selecciona entre el grupo que consiste en Cys e isoésteres de enlace peptídico entre Cys6 y Phe7 tales como, por ejemplo, Cys-CH₂-NH;

(c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; derivados N-alquilados de Phe, en los que el grupo N-alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, heterociclilo, arilo C₆₋₁₄ y heteroarilo (ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en el que el anillo de benceno del análogo de Phe puede estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

(d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butil-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val y Asn;

(e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(f) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (f) no es Arg;

(g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

(h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, tBu-Gly, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

(i) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

(j) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

Las variantes de CNP tienen una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, diseñados para aumentar la resistencia a la escisión con NEP, y se representan con la fórmula:

(x)-Gly₁-Leu₂-Ser₃-(a)₄-Gly₅-(b)₆-(c)₇-(d)₈-(e)₉-(f)₁₀-(g)₁₁-Asp₁₂-Arg₁₃-(h)₁₄-(i)₁₅-Ser₁₆-(j)₁₇-Ser₁₈-Gly₁₉-(k)₂₀-Gly₂₁-Cys₂₂-(z) (SEQ ID NO: 143), en la que:

(x) y (z) independientemente pueden estar ausentes o se puede seleccionar entre el grupo que consiste en compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de aminoácidos útiles en dirección a hueso o cartilago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas y derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, proteínas de fusión o secuencias peptídicas de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc.; restos que reducen la eliminación renal, que incluye, pero no se limita a, polímeros hidrófilos o solubles en agua tales como, por ejemplo, moléculas de PEG cargadas; y textos que comprenden, por ejemplo, los PEG, aminoácidos, carbohidratos, y/o ácidos hidrófobos;

(a) puede ser la Lys de tipo silvestre en esa posición o puede estar sustituida con una sustitución de aminoácido conservativa o un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, que incluye, pero no se limita a, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu, en la que en una realización (a) es Arg;

(b) se selecciona entre el grupo que consiste en Cys e isoésteres de enlace peptídico entre Cys6 y Phe7 tales como, por ejemplo, Cys-CH₂-NH;

(c) se selecciona entre el grupo que consiste en L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiónico; derivados N-alquilados de Phe, en los que el grupo N-alquilo es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y análogos de Phe, en los que una o más posiciones en orto, meta, y/o para del anillo de benceno del análogo de Phe están sustituidas con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, alcoxi C₁₋₆ lineal o ramificado, halo-alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalquilo C₃₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, heterociclilo y heteroarilo

(ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-fluoro-fenilalanina, 2-cloro-6-fluoro-3-metil-fenilalanina), o en el que el anillo de benceno del análogo de Phe puede estar sustituido con otro grupo arilo (los ejemplos no limitantes incluyen 1- y 2-naftilalanina) o con un grupo heteroarilo (los ejemplos no limitantes incluyen piridilalanina, tienilalanina y furilalanina);

5 (d) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, terc-butyl-Gly, Thr, Ser, Val y Asn;

(e) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Ser, Thr, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

10 (f) se selecciona entre el grupo que consiste en Lys, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln y Ser;

(g) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, Asn, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu;

15 (h) se selecciona entre el grupo que consiste en Ile, terc-butyl-Gly (tBu-Gly), Asn, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Ile;

(i) se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, Arg, Ser y Asn;

20 (j) se selecciona entre el grupo que consiste en Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) y ácido 2-amino-isobutírico (Aib); y

(k) se selecciona entre el grupo que consiste en Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser, e isoésteres de enlace peptídico tales como, por ejemplo, N-Me-Leu.

25 Para mejorar la administración de las variantes de CNP a los sitios diana de trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, displasia esqueléticas), las variantes de CNP se pueden unir (por ejemplo, en el extremo N-terminal y/o C-terminal) a restos de dirección a hueso o cartílago. Los ejemplos no limitantes de restos de dirección a hueso o cartílago incluyen bisfosfonatos; hidroxiapatita; glucosamina; colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo X); poliAsp; poliGlu; y secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas tales como, por ejemplo, osteocrina, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína.

Además de ser menos susceptibles a la escisión con NEP, las variantes de CNP tienen potencialmente una reducción de la afinidad con respecto al receptor de eliminación de NPR-C, a la vez que mantienen la funcionalidad de CNP. Además de la degradación mediada por NEP, la semivida de CNP22 se ve influida por el receptor de eliminación, NPR-C, que comparte una homología de secuencias de un 58 % con el dominio de unión a péptido extracelular de NPR-B. El CNP22 se une estrechamente no solamente a NPR-B (afinidad de 7-30 pM), sino también a NPR-C (11-140 pM) (Bennett, B.D. *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 23060-67 (1991); Koller K.J. I. Goeddel, D.V., Circulation, 86: 1081-88 (1992); Suga, S. *et al.*, Endocrinology, 130: 229-39 (1992)). A pesar de que la estructura cristalina de NPR-B todavía se tiene que informar, la homología de secuencia es así como similitudes entre las estructuras cristalinas de NPR-C y NPR-A (He, X.-L. *et al.*, Science, 293 (5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. *et al.*, J. Biol. Chem., 279 (27): 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361 (4): 698-714 (2006)) sugieren que NPR-B probablemente supone un plegamiento estructural global similar.

45 Por lo tanto, se construyó un modelo de homología de NPR-B basándose en el alineamiento de secuencias basado en la estructura y estructuras cristalográficas de los siguientes sistemas relacionados: CNP unido a NPR-C, ANP unido a NPR-A, y ANP unido a NPR-C (He, X.-L. *et al.*, Science, 293 (5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. *et al.*, J. Biol. Chem., 279 (27): 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361 (4): 698-714 (2006)). Basándose en las observaciones de que parece que el receptor determina la conformación del péptido unido, y que NPR-B se parece en la mayor medida a NPR-A con respecto a la estructura primaria y propiedades funcionales, el modelo de homología de NPR-B/CNP se construyó con la estructura cristalina de NPR-A/ANP como un modelo. Los datos de señalización publicados de variantes de CNP (documento de patente de Estados Unidos n.º 5.434.133 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0138134 A1), y de variantes de ANP funcionales que ya no se unen a NPR-C (Cunningham, EMBO 13 (11) 2508-15, 1994) se usaron para refinar e interpretar el modelo de NPR-B/CNP.

La presente divulgación incluye variantes de CNP diseñadas para aumentar la selectividad de NPR-B basándose en un modelo estructural basado en homología del complejo NPR-B/CNP. Combinando los datos de estructura experimental de ser informáticos de los péptidos natriuréticos unidos a los diversos receptores con los datos funcionales publicados, se generaron variantes de CNP que continúan uniéndose a NPR-B, pero que potencialmente pueden tener una reducción de la afinidad hacia el receptor de eliminación de NPR-C. Por ejemplo, NPR-C tiene una inserción única en una estructura de bucle en el sitio de unión a péptido, colocando sus restos del bucle más cerca a tales restos de péptido tales como Gly8 de CNP (o Gly9 de ANP), en comparación con los respectivos restos de bucle en NPR-A y NPR-B. Los estudios más tempranos indicaban que la mutación de G9T en ANP contribuye a reducir la afinidad hacia NPR-C, aumentando de ese modo la selectividad de NPR-A (Cunningham, EMBO J., 13 (11): 2508-15 (1994)). Por consiguiente, se generaron variantes de CNP para sustituir el correspondiente resto de

Gly8 con un resto más grande (Ser, Val, Thr o Asn) para interrumpir la unión de CNP a NPR-C sin influir en su unión a NPR-B. Además, se introdujeron una o más mutaciones en el extremo C-terminal de CNP, que incluyen Gly15 a Gly21, que se predice que interactúan con restos específicos de receptor, basándose en los análisis estructurales detallados de los complejos de receptor/péptido. Por ejemplo, una mutación de G19R en CNP22 no da como resultado una pérdida significativa de la actividad de señalización de NPR-B. Sin embargo, esta mutación no se puede modelar en la estructura cristalina disponible de NPR-C/CNP sin alterar las conformaciones de los restos vecinos. Estas observaciones sugieren que la mutación de G19R puede interrumpir de forma selectiva la unión de CNP a un receptor en particular, tal como NPR-C.

Las variantes de CNP pueden tener sustitución o sustituciones en uno o más sitios de Gly en las posiciones 1, 5, 8, 15, 19 y 21, para reducir la flexibilidad conformacional y de ese modo aumentar la especificidad del receptor. Los análisis comparativos de estructuras cristalinas de ANP unido a to NPR-C y NPR-A (Ogawa, H. *et al.*, J. Biol. Chem., 279: 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361: 698-714 (2006)) indican que la flexibilidad conformacional de ANP puede desempeñar un papel importante en la determinación de la selectividad del receptor.

Las variantes de CNP funcionales con afinidad potencialmente reducida hacia NPR-C pueden tener una más de las siguientes sustituciones de aminoácido: G1R, G1E, G5R, G5Q, G5S, F7Y, G8T, G8S, G8V, G8N, L9S, L9T, K10Cit, K10Q, K10S, I14N, G15R, G15S, G15N, G15Cit, S16Q, M17V, M17N, G19S, G19R, G19N, L20V, L20R, L20T, L20S, G21S, G21T y G21R. En una realización, las variantes de CNP pueden tener sustituciones en múltiples puntos en las posiciones 1, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 y/o 21, y pueden tener opcionalmente modificaciones en cualquiera de las otras posiciones en la secuencia peptídica de la variante.

En una realización más, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se pueden conjugar con restos, hasta una masa total caracterizada por los intervalos que se describen por lo general en el presente documento, por ejemplo, de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal y/o un sitio interno, para facilitar la dirección a hueso/cartílago, reducir NPR-C y la eliminación renal, aumentar la resistencia a la degradación con NEP, y/o aumentar la funcionalidad de CNP. En una realización, las variantes de CNP no se conjugan con un resto polimérico en un sitio dentro de la región cíclica (que corresponde de Cys6 a Cys22 de CNP22). Los ejemplos no limitantes de restos poliméricos o no poliméricos que se pueden conjugar con las variantes de CNP incluyen compuestos de dirección a hueso sintéticos tales como, por ejemplo, bisfosfonatos; secuencias de péptidos que se dirigen a hueso/cartílago tales como, por ejemplo, poliAsp y poliGlu; secuencias peptídicas obtenidas a partir de dominios de dirección a hueso de proteínas óseas tales como, por ejemplo, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína; secuencias peptídicas obtenidas a partir de los dominios funcionales de proteínas morfogenéticas óseas tales como, por ejemplo, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 y BMP8a; secuencias peptídicas obtenidas a partir de polipéptidos de origen de natriurético tales como, por ejemplo, NPPC, ANP y BNP; otros restos poliméricos o no poliméricos naturales tales como, por ejemplo, carbohidratos, ácidos grasos y fosfolípidos; polímeros hidrófilos sintéticos biocompatibles tales como, por ejemplo, PEG (o PEO); restos poliméricos o no poliméricos hidrófobos tales como, por ejemplo, ácido heptanoico y ácido pentanoico; y combinaciones de los mismos.

Las variantes de CNP que se describen en el presente documento pueden tener una actividad funcional sustancialmente similar o mejor que CNP22, por ejemplo, con respecto a la estimulación de la producción y señalización de cGMP. En una realización, las variantes de CNP *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 50 % del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μ M). En ciertas realizaciones, las variantes de CNP retienen al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 100 % de la actividad estimulación de cGMP de CNP22 de tipo silvestre *in vitro* o *in vivo*. En otra realización, las variantes de CNP presentan un aumento de la actividad estimulación de cGMP en comparación con CNP22. En ciertas realizaciones, las variantes de CNP *in vitro* o *in vivo* estimulan la producción de al menos aproximadamente un 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, un 500 % o más del nivel de cGMP producido con la misma concentración de wtCNP22 (por ejemplo, 1 μ M).

En una realización, la presente divulgación excluye todos los CNP-53 de tipo silvestre, CNP-22 de tipo silvestre, CNP-17 de tipo silvestre, BNP de tipo silvestre, y ANP de tipo silvestre de origen humano y de origen no humano conocidos. Por ejemplo, en una realización, la divulgación excluye el humano CNP-17, CNP-22 humano, CNP-22 de pollo (que corresponde a hCNP-22 (Leu9Val)), CNP-22 de trucha y anguila (que corresponde a hCNP-22 (Leu2Trp, Ser3Asn, Lys4Arg)), CNP22-I de rana (que corresponde a hCNP-22 (Leu2Tyr, Lys4Arg, Leu9Val, Ser16Ala, Met17Phe)), CNP22-II de rana (que corresponde a hCNP-22 (Leu2Thr, Ser16Ala)), CNP-53 humano, y CNP-53 de cerdo y rata (que corresponde a hCNP-53 (Gln17His, Ala28Gly)). En otra realización, la divulgación excluye fragmentos de NPPC, proCNP y CNP-53 que se producen por escisión proteolítica *in vivo* en seres humanos y animales no humanos. En otra realización más, de la divulgación se excluyen los siguientes fragmentos truncados de CNP-53: CNP-50, CNP-46, CNP-44, CNP-39, CNP-30, CNP-29, CNP-28, CNP-27 y CNP-26 humano de tipo silvestre.

En una realización más, la presente divulgación excluye péptidos CNP y fragmentos de los mismos aislados o buscados a partir de las especies de tiburones, *Triakis scyllia* y *Scyliorhinus canicula* (véase, por ejemplo, M. Takano *et al.*, Zool. Sci., 11: 451-454 (1994)), que incluyen:

RLKDLNPNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 204);
 LKDLNPNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-39) (SEQ ID NO: 205);
 KDLSNPNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 206); y
 GPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-22) (SEQ ID NO: 207).

5 En otra realización, la presente divulgación excluye péptidos CNP y fragmentos de los mismos aislados o buscados a partir de las especies de tiburón, *Lamna ditropis* (véase, por ejemplo, M. Takano *et al.*, Zool. Sci., 11: 451-454 (1994)), que incluyen:

10 RLLKDLNPNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 208);
 LKDLNPNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-39) (SEQ ID NO: 209);
 KDLSNPNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-38) (SEQ ID NO: 210);
 FKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-29) (SEQ ID NO: 211); y
 GPSRGCFGVKLDRIAMSGGLGC (CNP-22) (SEQ ID NO: 212).

15 Además, en otra realización, la presente divulgación excluye péptidos CNP y fragmentos de los mismos aislados de la especie de tiburón, *Squalus acantias* (véase, por ejemplo, M. Takano *et al.*, Zool. Sci., 11: 451-454 (1994)), que incluye:

20 RLLQDLNPNPLRFKGRSKKGPSRSCFGLKLDRIAMSGGLGC (CNP-41) (SEQ ID NO: 213); y
 GPSRSCFGLKLDRIAMSGGLGC (CNP-22) (SEQ ID NO: 214).

25 En una realización más, la presente divulgación excluye péptidos de CNP aislados de medaka y pez globo, denominados "CNP-1", "CNP-2", "CNP-3" y "CNP-4" en K. Inoue *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 100 (17): 10079-10084 (2003): GWNRCGFGLKLDRIAMSGGLGC (CNP-1 de medaka y pez globo) (SEQ ID NO: 215);
 PMVAGGGCFGMKMDRIGSISGLGC (CNP-2 de medaka) (SEQ ID NO: 216);
 GRSSMVGGRCFGMKIDRIGSISGLGC (CNP-2 de globo) (SEQ ID NO: 217); GGMRSFCFVRLERIGSFSGGLGC
 (CNP-3 de medaka) (SEQ ID NO: 218); GGLRSCFVRLARIGSFSGGLGC (CNP-3 de pez globo) (SEQ ID NO: 219);
 GGTSRSGCFGHKMDRIGTISGMGC (CNP-4 de medaka) (SEQ ID NO: 220); y
 30 GGSSRSGCFGHKMDRIGTISGMGC (CNP-4 de pez globo) (SEQ ID NO: 221).

35 En otra realización adicional otra realización, la presente divulgación excluye CNP-39 aislado de veneno de ornitorrinco y el fragmento de CNP-22 del mismo, denominado "ovCNP-39" y "ovCNP-39 (18-39)" en G. de Plater *et al.*, Toxicol., 36 (6): 847-857 (1998):

LLHDHPNPRKYKPAKGLSKGCFGLKLDRIAMSGGLGC (ovCNP-39) (SEQ ID NO: 222); y
 GLSKGCFGLKLDRIAMSGGLGC (ovCNP-39(18-39)) (SEQ ID NO: 223).

40 En otra realización, la presente divulgación excluye los siguientes péptidos como seres de la reforma específica en el documento US 2007/0197434:

45 Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (SEQ ID NO: 224);
 Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (SEQ ID NO: 225);
 Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Ala-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (SEQ ID NO: 226);
 Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (SEQ ID
 NO: 227);
 Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-
 Tyr (SEQ ID NO: 228); y
 50 Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID
 NO: 229).

55 En otra realización más, la divulgación excluye péptidos de la SEQ ID NO: 10, que se desvelan de forma genérica en el documento US 2007/0197434, en la que tales péptidos son variantes de CNP-17 que tienen ciertas sustitución o sustituciones de aminoácido natural en la posición o posiciones (s) 4, 5, 6, 11, 12, 14 y/o 14. Además, en otra realización, la divulgación excluye opcionalmente péptidos que corresponden a to hCNP-53 (Ser47Ala), hCNP-53 (Met48Gln), hCNP-53 (Met48Ala), y hCNP-53 (C-term.)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr.

60 En una realización, la presente divulgación excluye los péptidos de SEQ ID NOs 1-4 y 6-71 como se desvela de forma específica en el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.276.481. En otra realización, la divulgación excluye péptidos de la SEQ ID NO 5, que se desvelan de forma genérica el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.276.481, en la que tales péptidos son variantes de CNP17 que tienen al menos una sustitución de aminoácido natural en Leu9, Lys10, Leu11, Ser16, Met17, Gly19, y/o Leu20. Además, en otra realización, se excluyen variantes de CNP17 en las que CNP17 o variantes del mismo contienen N-Me-Phe7, o N-Me-Phe7 y N-Me-Leu11. En una realización más, la divulgación excluye variantes de CNP17 de la SEQ ID NO 5, como se desvela en el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.276.481, que están fusionadas o conjugadas con hormona de crecimiento (GH), factor 1 de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1), o hormona tiroidea (TH). En otra realización más,

se excluyen variantes de CNP22 en las que CNP22 está fusionado con GH, IGF-1 o TH, o unido a GH, IGF-1 o TH a través de un conector (por ejemplo, un conector peptídico). Además, en otra realización, se excluyen variantes de CNP17 en las que CNP17 o variantes del mismo están conjugados con biotina o fluoresceína en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal.

5 En una realización más, la presente divulgación excluye los péptidos de los Compuestos N^os 1-27, y SEQ ID NOs 1-17, 22-24, 30, 31 y 40-42 como se desvela de forma específica en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.434.133. En otra realización, la divulgación excluye péptidos de las SEQ ID NOs 18-21 y 25-29, que se desvelan de forma genérica en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.434.133. Además, en otra realización, la divulgación excluye los péptidos de las SEQ ID NOs 1-4 y 9 como se desvela de forma específica en el documento WO 94/20534.

C. Síntesis y purificación de variantes de CNP

15 En algunas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se producen mediante expresión recombinante, usando ciertas técnicas conocidas en la técnica en ciertas realizaciones. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I e II, D. N. Glover, Ed. (1985); y *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

20 En ciertas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se producen mediante un proceso recombinante que comprende cultivar en un medio una célula hospedadora que comprende un primer polinucleótido que codifica una variante de polipéptido CNP unido a un segundo polinucleótido que codifica un péptido o proteína escindible en condiciones que dan como resultado la expresión de un polipéptido de fusión codificado por los polinucleótidos, en el que el polipéptido de fusión comprende la variante de polipéptido CNP unida directamente al péptido o proteína escindible o unida indirectamente al mismo a través de un conector. En algunas realizaciones, la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la variante de polipéptido CNP unida al polinucleótido que codifica el péptido o proteína escindible. En ciertas realizaciones, el polipéptido de fusión se expresa como una proteína soluble o como un cuerpo de inclusión. El polipéptido de fusión expresado se puede aislar de la célula hospedadora o medio de cultivo, y el polipéptido de fusión aislado se puede poner en contacto con un agente de escisión para liberar la variante de CNP.

35 Las células hospedadoras usadas para producir variantes de CNP pueden ser células bacterianas, de levadura, de insecto, de vertebrado no mamífero, o de mamífero. Las células bacterianas incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares y cepas de *E. coli*. Los ejemplos no limitados de líneas celulares y cepas de *E. coli* incluyen BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [también denominado C41(DE3)], C43 [también denominado C43(DE3)], Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX, y Tuner(DE3). En una realización, las variantes de CNP y proteínas de fusión a CNP se producen usando células BL21(DE3). Las células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, mono, chimpancé, perro, gato, bovino, porcino, ratón, rata, conejo, oveja y humanas. Las células hospedadoras pueden ser células inmortalizadas (una línea celular) o células no inmortalizadas (primarias o secundarias) y puede ser cualquiera de una gran diversidad de tipos de células, tales como, pero no limitados a, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales de mama, células epiteliales intestinales), células de ovario (por ejemplo, células de ovario de hámster chino o CHO), células endoteliales, células de la glía, células neuronales, elementos de la sangre formados (por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea), condrocitos y otras células derivadas de hueso, y precursores de estos tipos de células somáticas. Las células hospedadoras que contienen la variante de ADN o ARN de CNP se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células, expresión del ADN o ARN e identificación/selección de células que expresan la variante de CNP.

50 En algunas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a aproximadamente 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C o 37 °C. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a aproximadamente 35 °C o 37 °C.

60 Los polinucleótido recombinantes que codifican variantes de polipéptido CNP (incluyendo proteínas de fusión a CNP) se expresan en un vector de expresión que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas de forma operativa a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende eficientes elementos de actuación en cis para expresión; otros elementos para expresión pueden ser suministrados por la célula hospedadora o sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudo o contenido en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante. El vector de expresión se inserta en una célula hospedadora apropiada, a través de transformación o transfección, para la expresión del polinucleótido que codifican polipéptido (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, (mencionado anteriormente)).

65

Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión contemplados para la producción de variantes de CNP, incluyendo proteínas de fusión a CNP escindibles, incluyen pJexpress, pJexpress401, pJexpress404, pET-15b, pET-21a, pET-22b, pET-31b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pMAL-c2X, pQE-30, pET-SUMO, y pTYB11 o expresión de construcciones en particular puede generar variantes de CNP solubles (incluyendo proteínas de fusión a CNP) o variantes de CNP insolubles (incluyendo proteínas de fusión a CNP) en forma de cuerpos de inclusión.

En algunas realizaciones, la expresión del polinucleótido o polinucleótidos que codifican una variante de CNP o proteína de fusión a CNP aumenta usando un vector inducible por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). En algunas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, en presencia de IPTG. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a aproximadamente 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C o 37 °C en presencia de IPTG. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras crecen o se cultivan durante un periodo de tiempo a aproximadamente 35 °C o 37 °C en presencia de IPTG 1 mM.

En otras realizaciones, las células hospedadoras se cultivan con IPTG a una concentración de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 2 mM, o de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1,5 mM, o de aproximadamente 0,4 mM a aproximadamente 1 mM. En ciertas realizaciones, el IPTG está en una concentración de aproximadamente 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2 mM. En una realización, la concentración de IPTG es aproximadamente 1 mM.

En ciertas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se expresan de forma recombinante como proteínas de fusión que comprenden una variante de polipéptido CNP y una proteína vehículo escindible o etiqueta escindible (por ejemplo, etiqueta peptídica), en las que la proteína de fusión comprende la variante de polipéptido CNP unida directamente con la proteína o etiqueta vehículo escindible o unida indirectamente a la misma a través de un conector. El uso de una proteína o etiqueta vehículo facilita, por ejemplo, la detección, aislamiento y/o purificación de la proteína de fusión. Las proteínas y etiquetas vehículo escindibles incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de histidina (por ejemplo, hexa-His); factor TAF12 de transcripción humano (TAF12), fragmentos de TAF12, dominio de plegamiento de histona TAF12, mutantes de TAF12 y fragmentos de los mismos, TAF12 (C/A), TAF12 (D/E), TAF12 (4D/4E), TAF12 (6D/6E), TAF12 (10D/10E), TAF12 (C/A y D/E), TAF12 (C/A y 4D/4E), TAF12 (C/A y 6D/6E), TAF12 (C/A y 10D/10E); cetosteroides isomerasa (KSI); proteína de unión a maltosa (MBP); β -galactosidasa (β -Gal); glutatión-S-transferasa (GST); tiorredoxina (Trx); dominio de unión a quitina (CBD); BMP-2, mutantes de BMP-2, BMP-2(C/A); SUMO; y mutantes y fragmentos de los mismos.

Una construcción de expresión puede expresar una proteína de fusión que comprende una variante de CNP y una proteína o etiqueta vehículo. La etiqueta puede ser una secuencia de aminoácidos que confiere una propiedad útil a la proteína de fusión. En una realización, la etiqueta es un dominio de unión a virando que se puede usar para purificar la proteína de fusión mediante la aplicación de la proteína de fusión a medios de separación que contienen el ligando. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un dominio de glutatión-S-transferasa (GST) se puede aplicar una columna de cromatografía que contiene medios de separación unidos a glutatión. Como otro ejemplo, una proteína de fusión que comprende proteína de unión a maltosa (MBP) como una etiqueta se puede aplicar a medios de separación que contienen maltosa. Como un ejemplo adicional, una proteína de fusión que comprende una etiqueta de polihistidina se puede aplicar a una columna de níquel, con lo que la quelación de la etiqueta de polihistidina a la columna de níquel facilita la purificación de la proteína de fusión. En otra realización, la etiqueta es un ligando. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender glutatión como una etiqueta y se puede aplicar a una columna de cromatografía que contiene medios de separación unidos con glutatión-S-transferasa. Los ejemplos no limitantes de proteínas y etiquetas vehículo para su uso en proteínas de fusión incluyen factor de transcripción humano TAF12 (TAF12), cetosteroides isomerasa (KSI), proteína de unión a maltosa (MBP), β -galactosidasa (β -Gal), glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina (Trx), dominio de unión a quitina (CBD), mutación de BMP-2 (BMPM), SUMO, CAT, TrpE, proteína A estafilocócica, proteínas estreptocócicas, proteína de unión a almidón, dominio de endoglucanasa A de unión a celulosa, dominio de endoglucanasa Cex de unión a celulosa, dominio de unión a biotina, recA, Flag, poli(His), poli(Arg), poli(Asp), poli(Gln), poli(Phe), poli(Cys), proteína fluorescente de color verde, proteína fluorescente de color rojo, proteína fluorescente de color amarillo, proteína fluorescente de color cian, biotina, avidina, estreptavidina, epítopos de anticuerpo, y mutantes y fragmentos de los mismos.

Para generar la variante de CNP diana, la proteína o etiqueta vehículo se puede escindir de la proteína de fusión por medio de escisión química, escisión con proteasa, o autoescisión de proteína. Los agentes de escisión químicos y proteolíticos a modo de ejemplo (sitios de escisión entre paréntesis) incluyen, pero no se limitan a, ácido fórmico (Asp-Pro), bromuro de cianógeno (CNBr) (Met-X), hidroxilamina (Asn-Gly), Factor Xa (IEGR-X) (SEQ ID NO: 230), Enterocinasa (DDDDK-X) (SEQ ID NO: 231), ProTEV (EXXXYXQ-G) (SEQ ID NO: 232), y proteasa de SUMO. Debido a la naturaleza de los tipos de escisión química en particular, la escisión usando ácido fórmico puede generar Pro-CNP, CNBr puede generar CNP que tiene sustitución de Met por Asn, y la hidroxilamina puede generar Gly-CNP. Como alternativa, la escisión química o con proteasa se puede evitar usando construcciones en particular (por ejemplo, pET-21a-CNP) que expresan variantes de CNP no como proteínas de fusión. La expresión de pET-

21a-CNP puede producir Met-CNP. O ciertas proteínas de fusión (por ejemplo, las que contienen inteína-CBD) se pueden someter a autoescisión para generar CNP.

En otras realizaciones, una proteína de fusión comprende un conector peptídico escindible entre una variante de CNP y una proteína o etiqueta vehículo (por ejemplo, etiqueta peptídica). En ciertas realizaciones, el conector peptídico escindible se selecciona entre el grupo que consiste en Asp-Pro, Asn-Gly, Met-X, Val-Asp-Asp-Arg (SEQ ID NO: 233), Gly-Ser-Asp-Arg (SEQ ID NO: 234), Ile-Thr-Asp-Arg (SEQ ID NO: 235), Pro-Gly-Asp-Arg (SEQ ID NO: 236), Ile-Glu-Gly-Arg-X (SEQ ID NO: 230), Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-X (SEQ ID NO: 231), Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly (SEQ ID NO: 232), Ala-Phe-Leu-Gly-Pro-Gly-Asp-Arg (SEQ ID NO: 237), y MGSSHHHHHSSGLVPRGSHTGDDDDKHMD (conector de pET-15b) (SEQ ID NO: 95), en los que X representa un aminoácido. En algunas realizaciones, el conector peptídico escindible se escinde con un agente de escisión seleccionado entre el grupo que consiste en paladio, bromuro de cianógeno (CNBr), ácido fórmico, hidroxilamina, clostridorol, trombina, quimotripsina, tripsina, proteasa similares a la tripsina, carboxipeptidasa, enteroquinasa (enteropeptidasa), proteasa de Kex 2, proteasa de Omp T, proteasa de Factor Xa, subtilisina, proTEV, proteasa de SUMO, proteasa de V8, proteasa del VIH, proteasa de rinovirus, proteasa de furilisina, proteasas de IgA, proteasa de Pace humano, colagenasa, proteasa de Nia, proteasa de 2Apro de poliovirus, proteasa de 3C de poliovirus, genenasa, furina, elastasa, Proteinasa K, pepsina, renina (quimosina), proteasas aspárticas microbianas, padolor, caldolor, quimopadolor, ficina (ficaina), bromelaina (bromelasa), catetispina B, caspasas, termolisina, Endoproteasa Arg-C, Endoproteasa Glu-C, Endoproteasa Lys-C, kalikreína, y plasmina.

En ciertas realizaciones, la proteína vehículo, etiqueta (por ejemplo, etiqueta peptídica) o conector peptídico escindible se escinde usando ácido fórmico para liberar la variante de CNP de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el ácido fórmico está en una concentración de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 %. En ciertas realizaciones, el ácido fórmico está en una concentración de aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o un 15 %. En ciertas realizaciones, el ácido fórmico está en una concentración de aproximadamente un 2 %, 5 % o un 10 %.

En otras realizaciones, la escisión de la proteína de fusión a CNP en presencia de ácido fórmico se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 75 °C, o de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 75 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. En algunas realizaciones la escisión en presencia de ácido fórmico se realiza a aproximadamente 20 °C, 22 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 42 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C o 80 °C. En ciertas realizaciones la escisión en presencia de ácido fórmico se realiza a aproximadamente 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C. En ciertas realizaciones la escisión en presencia de ácido fórmico se realiza a aproximadamente 55 °C o 70 °C.

En realizaciones adicionales, la escisión de la proteína de fusión a CNP en presencia de ácido fórmico se realiza durante un periodo de tiempo de aproximadamente 3 h a aproximadamente 48 h, o de aproximadamente 5 h a aproximadamente 48 h, o de aproximadamente 5 h a aproximadamente 36 h, o de aproximadamente 5 h a aproximadamente 24 h, o de aproximadamente 5 h a aproximadamente 18 h, o de aproximadamente 20 h a aproximadamente 24 h, o durante aproximadamente 6 h a aproximadamente 10 h. En ciertas realizaciones la escisión en presencia de ácido fórmico se realiza durante aproximadamente 5 h, 6 h, 12 h, 15 h, 18 h, 20 h o 24 horas.

En algunas realizaciones, la escisión de la proteína de fusión a CNP se realiza en presencia de aproximadamente un 2 %, 5 % o un 10 % de ácido fórmico a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 20 h a aproximadamente 36 h, o a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 15 h a aproximadamente 24 h, o a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 10 h a aproximadamente 21 h, o a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 6 h a aproximadamente 18 h. En ciertas realizaciones, la escisión de la proteína de fusión a CNP se realiza en presencia de aproximadamente un 2 % de ácido fórmico a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 20 h a aproximadamente 24 o 36 h, o a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 15 h a aproximadamente 24 h, o a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 10 h a aproximadamente 18 h, o a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 6 h a aproximadamente 10 horas.

La presente divulgación proporciona condiciones suaves para la escisión de proteínas de fusión de CNP usando ácido fórmico para proporcionar rendimientos elevados de las variantes de CNP. Las condiciones que se describen en el presente documento para escisión de proteína de fusión usando ácido fórmico también son adecuadas para escisión de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos o proteínas distintos de CNP, en los que las proteínas de fusión contienen un enlace peptídico de Asp-Pro.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión a CNP solubles o cuerpos de inclusión de proteína de fusión a CNP se tratan con un tampón y/o un detergente antes de la escisión química (por ejemplo, usando ácido fórmico) o la

escisión proteolítica de la proteína de fusión a CNP. Los ejemplos no limitantes de tampones incluyen B-PER II; B-PER II diluido (por ejemplo, dilución a 1/20); B-PER; tampón de fosfato de B-PER; tampones que contienen Tris (por ejemplo, Tris 25 mM, pH 7,5); tampones que contienen Tris y NaCl (por ejemplo, Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9); y PBS. En una realización, el tampón es B-PER II. Los ejemplos no limitantes de detergentes incluyen octilsacarosa, Triton X-100, Tween-20, NP-40, y CA-630. El detergente puede ser un tampón (por ejemplo, detergente al 1 % en tampón Tris 25 mM, pH 7,5). En ciertas realizaciones, el detergente es Triton X-100 o CA-630.

Se entiende que cualquiera de los métodos y condiciones que se han descrito anteriormente se pueden usar en combinación con cualquiera de los otros métodos y condiciones que se han descrito anteriormente para generar una variante de CNP desvelarán el presente documento.

En otras realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se sintetizan usando un sintetizador de péptidos se purifican de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con los métodos de Atherton y Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach, IRL Press (Oxford, England (1989)).

Los péptidos se pueden sintetizar basándose en, por ejemplo, la siguiente secuencia peptídica de CNP: G¹LS(K o R)GC⁹F⁷G⁸L(K o R o Nle o 6-OH-Nle)LDRIGSMSGLGC²².

Las variantes de CNP a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a:

- El Análogo A (GLSKGC(CH₂NH)FGLKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 56) se preparó por conversión del grupo "-C=O" de la estructura principal de C⁶ en un grupo "-CH₂";
- El Análogo B (GLSKGC(N-Me-Phe)GLKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 57) se preparó por conversión del grupo "-NH" de la estructura principal de F⁷ en un grupo "-N-CH₃";
- El Análogo E (GLSKGC(D-Phe)GLKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 136) se preparó usando D-Phe en F⁷;
- El Análogo F (GLSKGCF(tBu-Gly)LKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 58) se preparó usando un terc-butilo-Gly en G⁸;
- El Análogo G (GLSKGC(3-Cl-Phe)GLKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 137) se preparó por adición de un átomo de cloruro en una posición meta del anillo de fenilo de F⁷ (se pueden generar variantes similares haciendo sustituciones en orto, meta y/o para del anillo de fenilo de Phe⁷ con Cl, F, Br, OH y/o CH₃); y
- El Análogo H (GLSKGC[NHCH₂CH(Ph)CO]GLKLDRIIGSMSGLGC) (SEQ ID NO: 59) se preparó usando ácido (±)-3-(amino)-2-fenilpropiónico en F⁷.

Los ejemplos de variantes de CNP que tienen, por ejemplo, prolongaciones de aminoácido, sustituciones con aminoácidos naturales o no naturales o isoésteres de enlace peptídico, y/o conjugaciones con polímeros o restos hidrófobos, incluyen pero no se limitan a:

Análogo J	C6-CH ₂ -NH, N-Me-L9, N-Me-L20 (SEQ ID NO: 91)
Análogo K	N-Me-L9, N-Me-L20 (SEQ ID NO: 92)
Análogo L	N-Me-L9, N-Me-L11, N-Me-L20 (SEQ ID NO: 93)
Análogo M	N-Me-L9, N-Me-L11 (SEQ ID NO: 94)
Análogo Z	K4R, F7Y (SEQ ID NO: 95)
Análogo AA	K4R, G8V (SEQ ID NO: 96)
Análogo AB	K4R, G8S (SEQ ID NO: 97)
Análogo AC	K4R, G8T (SEQ ID NO: 98)
Análogo AD	K4R, L9T (SEQ ID NO: 99)
Análogo AE	K4R, G15R (SEQ ID NO: 100)
Análogo AF	K4R, G15Cit (SEQ ID NO: 101)
Análogo AG	K4R, M17V (SEQ ID NO: 102)
Análogo AH	K4R (SEQ ID NO: 35)
Análogo AJ	K4R, L20V (SEQ ID NO: 103)
Análogo AK	K4R, L20t-Bu-Ala (SEQ ID NO: 104)
Análogo AT	G1E, K4E (SEQ ID NO: 105)
Análogo AV	G1E, K4E - ácido pentanoico (unido en el extremo N-terminal) (SEQ ID NO: 106)
Análogo AW	G1E, K4E - ácido heptanoico (unido en el extremo N-terminal) (SEQ ID NO: 107)
Análogo AX	CNP17 (delta N-term) (SEQ ID NO: 2)
Análogo AY	GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36)
Análogo AZ	R-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 41)
Análogo BB	G1E - ácido heptanoico (unido en el extremo N-terminal) (SEQ ID NO: 108)
Análogo BC	G1E - ácido pentanoico (unido en el extremo N-terminal) (SEQ ID NO: 109)
Análogo BF	K4R, K10Cit (SEQ ID NO: 110)

Análogo BG	K4R, K10Q (SEQ ID NO: 111)
Análogo BH	K4R, K10R (SEQ ID NO: 112)
Análogo BJ	K4R, G15N (SEQ ID NO: 113)
Análogo BK	K4R, G15S (SEQ ID NO: 114)
Análogo BL	CNP-37 (SEQ ID NO: 60)
	CNP-53 (SEQ ID NO: 4)
Análogo CA	AAWARLLQEHPNA-CNP22 (SEQ ID NO: 61)
Análogo CB	AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (SEQ ID NO: 62)
Análogo CC	DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (SEQ ID NO: 63)
Análogo CD	SPKVMVQSGS-CNP17-KVLRRH (colas de BNP N- y C-terminales) (SEQ ID
	NO: 68)
Análogo CE	GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (HSA-CNP22) (SEQ ID NO: 81)
Análogo CF	GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (SEQ ID NO: 79)
	PEG(24K)-CNP22
	PEG(20K)-CNP22
	PEG(5K)-CNP22
	PEG(2K)-CNP22
	PEG(2K)-CNP17
	PEG(1K)-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36)
	PEG(1K)-CNP22
	PEO4-(PEO12)3(ramificado)-CNP2
	PEO12-CNP22
	PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36)
	PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36); y

SEQ ID NOs: 1 a 6 y 34 a 144, y variantes de las mismas que comprenden hasta 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones adicionales.

- 5 En una realización, las variantes de CNP se ciclan a través de formación de un enlace disulfuro entre Cys⁶ y Cys²². Cys⁶ puede ser un análogo de cisteína tal como, por ejemplo, homocisteína o penicilamina. En una realización más, las variantes de CNP se pueden ciclar con un enlace covalente formato de cabeza a cola, de cadena lateral a cadena lateral, de cadena lateral a cabeza, o de cadena lateral a cola. En una realización, el enlace covalente se forma entre un aminoácido en o hacia el extremo N-terminal y un aminoácido en o hacia el extremo C-terminal del péptido (denominados aminoácidos "terminales" en este contexto). En otra realización, el enlace covalente se forma entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos terminales. En otra realización más, el enlace covalente se forma entre la cadena lateral de un aminoácido terminal y el grupo terminal del otro aminoácido terminal, o entre los grupos terminales de los dos aminoácidos terminales.
- 10
- 15 El ciclado de cabeza a cola de la terminal amina con respecto al grupo carboxilo terminal se puede realizar usando un número de métodos, por ejemplo, usando éster de p-nitrofenilo, éster de 2,4,5-triclorofenilo, éster de pentafluorofenilo, el método de azida, el método de anhídrido mixto, HATU, una carbodimida (por ejemplo, DIC, EDC o DCC) con un catalizador tal como HOBt, HONSu o HOAt, o ciclado en resina.
- 20 Además, la estructura cíclica se puede formar a través de un grupo de unión por puente que implica a las cadenas laterales de restos de aminoácidos de la variante de CNP y/o los restos de aminoácido terminal. Un grupo de desplazamiento es un resto químico que permite el ciclado de dos porciones del péptido. Los ejemplos no limitantes de grupos de desplazamiento incluyen amidas, tioéteres, tioésteres, disulfuros, ureas, carbamatos, sulfonamidas, y similares. En la técnica se conoce una diversidad de métodos para la incorporación de unidades que tienen tales grupos de desplazamiento. Por ejemplo, un puente de lactama (es decir, una amida cíclica) se puede formar entre el grupo amino N-terminal o un grupo amino en una cadena lateral y el ácido carboxílico C-terminal o un grupo carboxilo en una cadena lateral, por ejemplo, la cadena lateral de lisina u ornitina y la cadena lateral de ácido glutámico o ácido aspártico. Un tioéster se puede formar entre el grupo carboxilo C-terminal o un grupo carboxilo en una cadena lateral del grupo tiol en la cadena lateral de cisteína o un análogo de cisteína.
- 25
- 30 Como alternativa, una reticulación se puede formar por incorporación de un resto de lantionina (tio-dialanina) para unir restos de alanina que se unen de forma covalente entre sí mediante un enlace tioéter. En otro método, un agente de reticulación, tal como un ácido dicarboxílico (por ejemplo, ácido succínico (ácido octanodioico)), puede unir los grupos funcionales de cadenas laterales de aminoácido, tales como grupos amino libre, hidroxilo, y tiol.
- 35
- 40 También se puede usar ciclado catalizado por enzimas. Por ejemplo, se ha informado que el dominio de tioesterase de la tirocidina sintetasa se puede usar para ciclar un precursor tioéster, un montante de subtilisina se puede usar para ciclar ésteres de fenilalanilamida de glicolato peptídico, y la ligasa 16G3 de anticuerpos se puede usar para ciclar un a p-nitrofeniléster. Para una revisión de ciclado de péptidos, véase Davies, J. Peptide Sci., 9: 471-501 (2003), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En ciertas realizaciones, el producto ciclado final tiene una pureza de al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %.

D. Variantes de CNP Modificado Químicamente

La modificación química de CNP22 o variantes del mismo puede impartir potencialmente propiedades ventajosas a los péptidos CNP modificados, tales como aumento de la estabilidad y semivida y reducción de la inmunogenicidad (para una discusión general de modificación química de proteínas terapéuticas, véase Pharmazie, 57 (1): 5-29 (2002)). Por ejemplo, los restos de unión naturales o sintéticos, poliméricos o no poliméricos (por ejemplo, PEG) a péptidos CNP, para aumentar la masa total de los péptidos CNP a los intervalos que por lo general se describen en el presente documento, por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 2,6 o 2,8 kDa a aproximadamente 6 o 7 kDa, puede reducir la susceptibilidad de los péptidos modificados a la escisión *in vivo* mediante exopeptidasas y/o endopeptidasas (por ejemplo, NEP). Además de la PEGilación, la glicosilación y otros procedimientos de derivatización química, por ejemplo, modificación por fosforilación, amidación, carboxilación, acetilación, metilación, y creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres y derivados de N-acilo, también puede enmascarar regiones potencialmente inmunogénicas y/o regiones proteolíticamente sensibles (Science, 303: 480-482 (2004)).

Los ejemplos de modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, el método de adición de polímero de Bednarsaki y el método de reticulación de Altus Corporation para aumentar la estabilidad y la resistencia a proteasas y reducir la inmunogenicidad. Bednarsaki mostró que la adición de polímero puede aumentar la estabilidad del polímero a temperatura (J. Am. Chem. Soc., 114 (1): 378-380 (1992)), y Altus Corporation encontró que la reticulación con glutaraldehído puede aumentar la estabilidad enzimática.

La modificación química de polipéptidos se puede realizar de una manera no específica (que conduce a mezclas de especies derivatizadas) o de una manera específica del sitio (por ejemplo, basándose en derivatización dirigida por reactividad de macromoléculas de tipo silvestre y/o modificación selectiva del sitio usando una combinación de mutagénesis dirigida al sitio y modificación química) o, como alternativa, usando métodos de ligamiento de proteína expresada (Curr. Opin. Biotechnol., 13 (4): 297-303 (2002)).

Variantes de CNP Pegilado

Para aumentar la estabilidad (por ejemplo, resistencia a la degradación de NEP), CNP22 o variantes del mismo (incluyendo las que tienen adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácido) se conjugan con polímeros hidrófilos, naturales o sintéticos, para aumentar la masa total de los péptidos CNP modificados hasta un intervalo de de aproximadamente 2,6 kDa o 2,8 kDa a aproximadamente 4, 5, 6, 7 o una cantidad superior de kDa. En ciertas realizaciones, los polímeros hidrófilos añadidos tienen una masa total de aproximadamente 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, o aproximadamente 5 kDa.

Los polímeros hidrófilos son solubles en agua de modo que los péptidos CNP conjugados a los mismos no precipitan en un entorno acuoso (por ejemplo, fisiológico). Además, los polímeros hidrófilos son biocompatibles, es decir, no causan lesión, toxicidad o una reacción inmunológica *in vivo*.

Los polímeros hidrófilos pueden estar ramificados o no ramificados. En una realización, los polímeros hidrófilos no están ramificados.

Diversos sitios de conjugación de CNP22 o variantes del mismo a un polímero hidrófilo son posibles, e incluyen, pero no se limitan a: (1) solamente en el extremo N-terminal; (2) solamente en el extremo C-terminal; (3) solamente en un sitio interno (por ejemplo, Lys4); (4) tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal; (5) tanto en el extremo N-terminal como en un sitio interno; y (6) tanto en el extremo C-terminal como en un sitio interno. En una realización, CNP22 o variantes del mismo se conjugan con un polímero hidrófilo solamente en el extremo N-terminal. En otra realización, la conjugación se produce solamente en un sitio interno (por ejemplo, Lys4). En otra realización más, la conjugación se traduce en el extremo N-terminal y un sitio interno (por ejemplo, Lys4). Además, en otra realización, para mejor funcionalidad, los péptidos the CNP no se conjugan con un polímero hidrófilo en un sitio (por ejemplo, Lys10) dentro del dominio cíclico (que corresponde de Cys6 a Cys22 de CNP22). Si la conjugación a un polímero hidrófilo se basa en la formación de enlaces con un grupo amino primario reactivo en el péptido CNP, la conjugación en un sitio interno (por ejemplo, Lys4 y/o Lys10) se puede evitar por sustitución de Lys4 y/o Lys10 con un aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no contiene un grupo amino primario reactivo en una cadena lateral, tal como, por ejemplo, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu o citrulina (Cit). En una realización en particular, Lys4 y/o Lys10 se sustituyen con Arg. En otra realización, Lys10 no se sustituye con Arg.

Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrófilos incluyen polímeros formados a partir de monómeros que portan ácido carboxílico (por ejemplo, ácido metacrílico (MA) y ácido acrílico (AA)), alcoholes de polivinilo, polímeros formados a partir de monómeros que portan hidroxilo (por ejemplo, metacrilato de hidroxietilo (HEMA), metacrilato de hidroxipropilo (HPMA), metacrilamida de hidroxipropilo, y metacrilato de 3-trimetilsililpropilo (TMSPMA)), óxidos de polialquileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), monoalcoxi C₁-C₁₀-PEGs (por ejemplo, monometoxi-PEG), tresil monometoxi-PEG, ariloxi-PEGs, acrilato de PEG (PEGA),

metacrilato de PEG, PEG propionaldehído, carbonato de bis-succinimidilo PEG, copolímeros de 2-methacrililoetilfosforilcolina (MPC) y N-vinil pirrolidona (VP), poli(N-vinil pirrolidona) hidroxil funcional (PVP), SIS-PEG (SIS es copolímero de bloque de poliestireno-poliisobutileno-poliestireno), poliestireno-PEG, poliisobutileno-PEG, PCL-PEG (PCL es policaprolactona), PLA-PEG (PLA es ácido poliláctico), PMMA-PEG (PMMA es poli(metacrilato de metilo)), PDMS-PEG (PDMS es polidimetiloxanona), PVDF-PEG (PVDF es fluoruro de polivinilideno), tensioactivos PLURONIC™ (óxido de polipropileno-co-poli(etilenglicol)), poli(tetrametilenglicol), poli(L-lisina-g-etilenglicol) (PLL-g-PEG), poli(L-lisina-g-ácido hialurónico) (PLL-g-HA), poli(L-lisina-g-fosforil colina) (PLL-g-PC), poli(L-lisina-g-vinil pirrolidona) (PLL-g-PVP), poli(etilimina-g-etilenglicol) (PEI-g-PEG), poli(etilimina-g-ácido hialurónico) (PEI-g-HA), poli(etilimina-g-fosforil colina) (PEI-g-PC), poli(etilimina-g-vinil pirrolidona) (PEI-g-PVP), PLL-co-HA, PLL-co-PC, PLL-co-PVP, PEI-co-PEG, PEI-co-HA, PEI-co-PC, PEI-co-PVP, celulosa y derivados de la misma (por ejemplo, hidroxietil celulosa), dextrano, dextrinas, ácido hialurónico y derivados del mismo (por ejemplo, hialuronato sódico), elastina, quitosán, sulfato acrílico, sulfonato acrílico, sulfamato acrílico, sulfato metacrílico, sulfonato metacrílico, sulfamato metacrílico, polímeros y copolímeros de los mismos y polímeros y copolímeros de combinaciones de los mismos.

En una realización en particular, el polímero hidrófilo es poli(etilenglicol) (PEG), también denominado poli(óxido de etileno) (PEO). Como se usa en el presente documento, el término "PEG" o "PEO" incluye todas las formas de PEG, ramificado y sin ramificar, que se pueden usar para derivatizar polipéptidos, que incluyen, pero no se limitan a, mono-alcoxi (C₁-C₁₀)-PEGs y ariloxi-PEGs.

En una divulgación, los conjugados de PEG-CNP comprenden un polímero de PEG (o PEO) de fórmula (CH₂CH₂O)_n, en la que n es un número entero de aproximadamente 6 a aproximadamente 100, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,3 kDa a aproximadamente 5 kDa. En otra divulgación, n es un número entero de aproximadamente 12 a aproximadamente 50, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 2,5 kDa. Además, en otra divulgación, n tiene de aproximadamente 12 a aproximadamente 24, y el polímero de PEG tiene de aproximadamente 0,6 kDa a aproximadamente 1,2 kDa. En una divulgación adicional, el grupo hidroxilo terminal del polímero de PEG está protegido con un grupo no reactivo. En una divulgación en particular, el grupo con protección terminal es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo inferior tal como metilo, de modo que el polímero de PEG termina en un grupo alcoxi. En una divulgación, el polímero de PEG no está ramificado. En otra divulgación, CNP22 o variantes del mismo están conjugados con un polímero de PEG solamente en el extremo N-terminal.

Los PEG y los PEO incluyen potencialmente moléculas con una distribución de pesos moleculares, es decir, son potencialmente polidispersos, dependiendo de la manera en la que se preparan. La distribución de tamaño/masa de una preparación polimérica se puede caracterizar de forma estadística por su peso molecular medio en peso (M_w) y su peso molecular medio e en l número (M_n), cuya proporción se denomina índice de polidispersión (M_w/M_n). M_w y M_n se pueden medir por espectroscopía de masas. Las variantes de PEG-CNP conjugadas con un resto de PEG con un tamaño superior a 1,5 kDa pueden presentar un intervalo de pesos moleculares debidos a la naturaleza polidispersa de la molécula de PEG precursora. Por ejemplo, en el caso de mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF Co.), las masas moleculares de las moléculas de PEG se distribuyen en un intervalo de aproximadamente 1,5 kDa a aproximadamente 3 kDa, con un índice de polidispersión de 1,036. Por el contrario, los PEG conjugados con CNP22 o variantes del mismo que usan reactivos de MS(PEG)_n (n = 4, 8, 12 o 24, indicados como, por ejemplo, "PEO12" o "PEO24") de Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois) son monodispersos, y tienen longitud de cadena discontinua y peso molecular definido.

En la técnica se conocen métodos para generar polipéptidos que comprenden un resto de PEG (véase, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.824.784). Los métodos para preparar péptidos CNP PEGilado por lo general comprenden las etapas de (a) hacer reaccionar CNP22 o una variante del mismo con un reactivo de PEGilación en condiciones adecuadas para unir PEG al péptido CNP (por ejemplo, en el extremo N-terminal), y (b) obtener el producto o productos de reacción. Dado que la PEGilación en un péptido CNP podría alterar de forma significativa su unión a NPR-B, dependiendo del tamaño del resto de PEG y la posición de la PEGilación, se pueden explorar diferentes tipos de PEG y de condiciones de reacción de PEGilación. La química que se puede usar para la PEGilación de un péptido CNP incluye acilación de la amina o aminas primarias reactivas del péptido usando el ester de NHS de metoxi-PEG (O-[(N-Succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS o metoxi-PEG-SPA da como resultado un enlace de amida que elimina cualquier carga de la amina primaria original. Los péptidos de PEG-CNP designados con el símbolo "PEO12" o "PEO24", así como los designados con el símbolo "PEG1K", "PEG2K", "PEG5K" o "PEG20K", están PEGilados a través de reacción de un grupo amino primario en el péptido con un reactivo de PEG activado con éster de NHS, protegido en el extremo de metoxi. También se pueden preparar variantes de PEG-CNP con otros métodos, por ejemplo, a través de aminación reductora que involucra a un grupo amino primario en el péptido y un PEG aldehído, tal como, por ejemplo, PEG-propionaldehído, o mono-alcoxi C₁-C₁₀ o derivados de ariloxi del mismo (véase el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.252.714).

A diferencia de la síntesis de proteínas de ribosoma, la síntesis de péptidos sintéticos evoluciona a partir del extremo C-terminal al extremo N-terminal. Por consiguiente, Boc-PEG (que contiene terc-butiloxicarbonilo (Boc)) es un método para unir PEG al extremo C-terminal de un péptido (R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 (14): 2149-2154 (1963)). Como alternativa, se puede usar química de Fmoc (fluorenilmetoxicarbonilo) (E. Atherton y R.C.

Sheppard, Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach, IRL Press (Oxford, Inglaterra (1989)).

Los presentes métodos para preparar variantes de PEG-CNP proporcionan una mezcla sustancialmente homogénea de conjugados de polímero-proteína. Después de purificación, las preparaciones de PEG-CNP separadas son lo suficientemente puras para ensayo *in vitro* e *in vivo* de propiedades biológicas. Como se demuestra en el presente documento, ciertas variantes de PEG-CNP presentan una reducción de la susceptibilidad a la escisión con NEP y una funcionalidad sustancialmente similar o mejor (por ejemplo, estimulación de la producción de cGMP).

Como se describe en el presente documento, las reacciones de PEGilación de CNP22 o variantes del mismo, usando proporciones apropiadas de reactivo de PEGilación/péptido CNP y condiciones de reacción, proporcionan derivados de PEG-CNP. La naturaleza y al alcance de la PEGilación se pueden determinar usando, por ejemplo, análisis de PAGE y HPLC. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 99 % de CNP22 o variantes del mismo están mono-PEGiladas en el extremo N-terminal. Para optimizar los efectos beneficiosos de la PEGilación en las propiedades biológicas de un péptido CNP, la longitud, conformación (por ejemplo, ramificado o lineal), y/o funcionalización del polímero (por ejemplo, adición de un grupo con carga negativa) de un resto de PEG puede variar. Las variantes de CNP PEGilado se someten a ensayo para resistencia a NEP, farmacocinética y bioactividad (por ejemplo, la capacidad para unirse a NPR-B y estimular la generación de cGMP). Las variantes de CNP PEGilado que muestran un aumento de la resistencia a NEP y al menos aproximadamente un 50 % de la actividad estimulación de cGMP de CNP22 se pueden someter a ensayo adicionalmente, por ejemplo, *in vitro* en un modelo de acondroplasia basado en células de condrosarcoma de rata e *in vivo* en un modelo animal de acondroplasia de murino.

E. Métodos de Uso de Variantes de CNP, Composiciones Farmacéuticas de Variantes de CNP, y Vías de Administración

Métodos de uso de Variantes de CNP

Trastornos Relacionados con los Huesos

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) desempeñan papeles importantes en la formación de hueso, y las mutaciones en genes del receptor FGF (FGFR 1, 2 y 3) dan lugar a una diversidad de malformaciones esqueléticas hereditarias (Curr. Biol., 5: 500-507 (1995)). En particular, la activación de las mutaciones en FGFR-3 son responsables de trastornos de los huesos largos, incluyendo la acondroplasia, la forma más común de enanismo genético humano (Nature, 371: 252-254 (1994); Cell, 78: 335-342 (1994)), el trastorno más leve, hipoacondroplasia (Ann. N.Y. Acad. Sci., 785: 182-187 (1996)), y la displasia tanatóforica más grave y letal neonatal (TD) de tipos I e II (Hum. Mol. Genet., 5: 509-512 (1996); Nat. Genet., 9: 321-328 (1995)). Los modelos de ratón que sobreexpresan FGF-2, en consecuencia activan FGFR-3, muestran un acortamiento de los huesos largos y macrocefalia (Mol. Biol. Cell, 6: 1861-73 (1995)). De forma coherente con este modelo, los ratones deficientes en FGFR-3 presentan un sobre crecimiento esquelético notable con placas de crecimiento más anchas (Nature Genet., 12: 390-397 (1996)).

Los experimentos complementarios con CNP, NPR-B y NPR-C sugieren una relación entre el ligando peptídico, los receptores correspondientes, y el crecimiento óseo. La activación de NPR-B mediante concentraciones de CNP en plasma elevadas en ratones transgénicos causa un crecimiento excesivo del esqueleto (Nat. Med., 10: 80-86 (2004)) histológicamente similar al del cartílago de la placa de crecimiento de ratones con supresión genética de FGFR-3 (Nat. Genet., 4: 390-397 (1996)). En ratones con supresión genética de NPR-C, la eliminación de CNP mediada por NPR-C se debería eliminar; de forma coherente con esta predicción, los animales con supresión genética muestran huesos largos alargados y vértebras alargadas con cifosis (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7403-08 (1999)). Por el contrario, los ratones con supresión genética de CNP se ven empujados con huesos largos y vértebras más cortos, un fenotipo histológicamente similar al de la acondroplasia, y tienen un aumento de la mortalidad como resultado de maloclusión limitación pulmonar de la caja de las costillas pequeñas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 4016-4021 (2001)). De forma coherente con el papel propuesto de CNP como un activador de NPR-B, el ratón con supresión genética de NPR-B tiene el mismo fenotipo esquelético empujado y un aumento de la mortalidad que el ratón con supresión genética de CNP (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 17300-05 (2004)). Además, en un modelo de ratón de acondroplasia con FGFR-3 activado en el cartílago, la sobreexpresión dirigida de CNP en condrocitos contrarresta el enanismo (Yasoda *et al.*, Nat. Med., 10: 80-86 (2004)). Además, se ha mostrado que CNP desempeña un papel en la regulación del crecimiento del hueso endocondral y actividad de condrocitos, que incluye, pero no se limita a, proliferación y diferenciación de condrocitos, inhibición de la ruta de señalización de quinasa quinasa/MEK (Raf-1) de proteína activada por mitógenos (MAP), y estimulación de la osificación endocondral (Yasoda *et al.*, Nat. Med., 10: 80-86 (2004)). Estos resultados sugieren que la activación del sistema CNP/NPR-B es una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de la acondroplasia humana.

Mediante la estimulación de la producción, proliferación y diferenciación de condrocitos de matriz y aumentando el crecimiento de hueso largo, las variantes de CNP de la divulgación son útiles para el tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, que padecen un trastorno relacionado con los huesos, tal como una displasia esquelética. Los ejemplos no limitantes de trastornos sensibles a CNP relacionados con los huesos y displasias esqueléticas incluyen acondroplasia, hipoacondroplasia, estatura baja, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia

tanatofórica, osteogénesis imperfecta, acondrogénesis, condrodisplasia punctata, acondroplasia homocigótica, condrodisplasia punctata, displasia camptomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis imperfecta, síndromes de polidactilia y costillas cortas, hipoacondroplasia, tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, displasia metafisaria de tipo Jansen, displasia espondiloepifisiaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, displasia mesomélica de tipo Langer de fémur corto congénita, displasia mesomélica de 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 espondiloepimetáfisaria. Además, las variantes de CNP son útiles como un complemento o una alternativa a la hormona del crecimiento para el tratamiento de estatura baja idiopática y otras displasias esqueléticas.

Además, las variantes de CNP son útiles para el tratamiento otras afecciones y trastornos relacionados con los huesos, tales como raquitismo, raquitismo hipofosfatémico [incluyendo raquitismo hipofosfatémico relacionado con el cromosoma X (también denominado raquitismo resistente a la vitamina D) y raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante], y osteomalacia [incluyendo osteomalacia inducida por tumor (también denominada osteomalacia oncogénica u osteomalacia hipofosfatémica oncogénica)].

Las variantes de CNP de la divulgación también se pueden usar para tratar la artrosis. La artrosis es una enfermedad degenerativa del cartílago articular y frecuentemente se produce en las personas de edades avanzadas. La artrosis implica la destrucción del cartílago y cambio proliferativa o en el hueso y el cartílago que resultan de la degeneración de los componentes articulares, con el cambio dando como resultado una artritis secundaria (por ejemplo, sinovitis). Las proteínas de la matriz extracelular, que son la entidad funcional del cartílago, se reducen, y el número de condrocitos disminuye en la artrosis (Arth. Rheum. 46 (8): 1986-1996 (2002)). Al estimular la producción, crecimiento y diferenciación de condrocitos de la matriz, las variantes de CNP son útiles para contrarrestar los efectos no deseados de FGF-2 y aumentar la síntesis de la matriz en sujetos que padecen artritis, incluyendo artrosis, tratando de ese modo la artritis, incluyendo la artrosis.

Trastornos del Músculo Liso Vascular

El CNP y otros péptidos vasoactivos (incluyendo ANP, BNP y urodilatina) tienen propiedades vasodilatadoras y diuréticas si desempeñan un papel importante en la homeostasis cardiovascular (J. Cardiovasc. Pharmacol., 117: 1600-06 (1998); Kidney Int., 49: 1732-37 (1996); Am. J. Physiol., 275: H1826-1833 (1998)). El CNP se distribuye ampliamente en el sistema cardiovascular, especialmente en concentración elevada en células endoteliales vasculares (J. Cardiovasc. Pharmacol., 117: 1600-06 (1998)). El CNP es un relajante potente del músculo liso vascular, en particular en la circulación coronaria (Biochem. Biophys. Res. Commun., 205: 765-771 (1994)), y es un inhibidor de la proliferación de células del músculo liso (Biochem. Biophys. Res. Commun., 177: 927-931 (1991)). Aunque el efecto vasodilatador de CNP es menos potente que el de ANP (aproximadamente 1:100) (Hypertens. Res., 21: 7-13 (1998); Am. J. Physiol., 275: L645-L652 (1998)), el ARNm del CNP aumenta como respuesta a la tensión al cizallamiento (FEBS Lett., 373: 108-110 (1995)) y los niveles en plasma de CNP aumentan en patologías cardiovasculares inflamatorias (Biochem. Biophys. Res. Commun., 198: 1177-1182 (1994)). Se ha mostrado que el CNP suprime la inflamación a través de la inhibición de infiltración de macrófagos en arterias carótidas lesionadas de conejos (Circ. Res., 91: 1063-1069 (2002)) e inhibe directamente la proliferación de fibroblastos cardíacos a través de una ruta dependiente de NPR-B/cGMP (Endocrinology, 144: 2279-2284 (2003)).

Las acciones cardiovasculares de CNP están mediadas por la activación de los subtipos de NPR, NPR-B y NPR-C (Endocrinology, 130: 229-239 (1992)), esta última representando un 95 % de los NPR expresados *in vivo* (Science, 293: 1657-1662 (2001)). La ruta de CNP/NPR-B conduce a un aumento de cGMP, un mensajero secundario bien establecido en el sistema cardiovascular. La porción de 37 aminoácidos de NPR-C del extremo C-terminal tiene una secuencia consenso que interactúa con la proteína G heterotrimélica G_i (J. Biol. Chem., 274: 17587-17592 (1999)), que se ha mostrado que regula la actividad de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (J. Biol. Chem., 276: 22064-70 (2001); Am. J. Physiol., 278: G974-980 (2000); J. Biol. Chem., 271: 19324-19329 (1996)). El CNP media la hiperpolarización y la relajación del músculo liso a través de la activación de NPR-C y la apertura de canales de K⁺ de rectificación hacia dentro, regulados por la proteína G (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 1426-1431 (2003)). De forma análoga, el CNP tiene importantes efectos antiproliferativos en fibroblastos cardíacos y, a través de la interacción con NPR-C, regula el flujo sanguíneo local y la presión sanguínea sistémica hiperpolarizando las células del músculo liso (R. Rose and W. Giles, J. Physiol. 586: 353-366 (2008)).

Al unirse a NPR-B en células de músculo liso vascular, CNP22 estimula la producción de cGMP, que actúa como un mensajero intracelular secundario para causar en última instancia la relajación de los vasos sanguíneos. Basándose en las acciones hipotensoras de CNP, las variantes de CNP de la divulgación son útiles para tratar hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, edema cardíaco, nefredema, edema hepático, insuficiencia renal aguda y crónica, y así sucesivamente. Además, la activación de la señalización de cGMP suprime el crecimiento de células de músculo liso vascular. Por consiguiente, las variantes de CNP de la divulgación se pueden usar para tratar afecciones o enfermedades causadas por el crecimiento anómalo de células del músculo liso vascular, que incluyen, pero no se limitan a, reestenosis y arteriosclerosis.

Los estudios descritos anteriormente sugieren que el CNP puede ser un candidato terapéutico potencial para la relajación y remodelación del músculo liso vascular. Los efectos farmacológicos del CNP en relación con ciertos trastornos se han atribuido, en parte, a efectos vasoprotectores en lugar de a la actividad vasodilatadora (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 170: 1204-1211 (2004)). Por lo tanto, las variantes de CNP de la presente divulgación son
 5 útiles para tratar afecciones, por ejemplo, trastornos del músculo liso vascular, en las que el CNP puede tener un efecto vasoprotector, que incluye, pero no se limita a, inducción de la relajación del músculo liso e inhibición de la infiltración de macrófagos en el tejido cardíaco. En una divulgación, las variantes de CNP se usan para tratar insuficiencia cardíaca congestiva, que incluye, pero no se limita a, insuficiencia cardíaca descompensada aguda e
 10 insuficiencia cardíaca congestiva aguda. En otra divulgación, las variantes de CNP se usan para tratar asma, cardiomiopatía y reestenosis de arterias coronarias (aumentando la relajación de las células del músculo liso y disminuyendo la proliferación de células del músculo liso).

Composiciones Farmacéuticas de Variantes CNP

15 En realizaciones adicionales, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una variante de CNP, y uno o más excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden tradicionalmente uno u otros agentes biológicamente activos más (por ejemplo, inhibidores de proteasas, tirosina quinasas receptoras, y/o el receptor de eliminación NPR-C).

20 En algunas realizaciones, las composiciones comprenden la variante de CNP deseada con una pureza de al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 %. En ciertas realizaciones, las composiciones contienen menos de aproximadamente un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o un 0,5 % de contaminantes macromoleculares, tales como otras proteínas de mamífero (por ejemplo, de ser humano) y otras variantes de CNP.

25 Los ejemplos no limitantes de excipientes, vehículos y diluyentes incluyen vehículos, líquidos, tampones, agentes de isotonicidad, aditivos, estabilizantes, conservantes, solubilizantes, tensioactivos, emulgentes, agentes humectantes, y así sucesivamente. Las composiciones pueden contener líquidos (por ejemplo, agua, etanol); diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, fosfato, tampones de acetato, tampones de citrato), pH y fuerza iónica;
 30 detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80); antioxidantes (por ejemplo, metionina, ácido ascórbico, metabisulfito sódico); conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico o, m-cresol); y sustancias de aumento del volumen (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa). El uso de excipientes, diluyentes y vehículos en la formulación de las composiciones farmacéuticas se conoce en la técnica; véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edición, páginas 1435-1712, Mack Publishing Co. (Easton,
 35 Pensilvania (1990)), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Por ejemplo, los vehículos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, vehículos y adyuvantes, así como vehículos de implante, y cargas sólidas o líquidas inertes, no tóxicas y materiales encapsulación que no reaccionan con el principio o principios activos. Los ejemplos no limitantes de vehículos incluyen solución salina tamponada con
 40 fosfato, solución salina fisiológica, agua, y emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite/agua). Un vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), un aceite vegetal, y mezclas de los mismos.

45 En algunas realizaciones, las composiciones son formulaciones líquidas. En ciertas realizaciones, las formulaciones comprenden una variante de CNP en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente
 50 10 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

En otras realizaciones, las composiciones comprenden una solución tampón o agente de tamponamiento para mantener el pH de una solución o suspensión que contiene CNP dentro de un intervalo deseado. Los ejemplos no limitantes de soluciones tampón incluyen solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, y solución salina tamponada con Hank. Los agentes de tamponamiento incluyen, pero no se limitan a, acetato
 55 sódico, fosfato sódico, y citrato sódico. También se pueden usar mezclas de agentes de tamponamiento. En ciertas realizaciones, el agente de tamponamiento es ácido acético/acetato o ácido cítrico/citrato. La cantidad de agente de tamponamiento adecuada en una composición depende en parte del tampón usado en particular y del pH deseado de la solución o suspensión. Por ejemplo, el acetato es un tampón de pH más eficaz a pH 5 que a pH 6, de modo que se puede usar menos acetato en una solución a pH 5 que a pH 6, En algunas realizaciones, el agente de
 60 tamponamiento tiene una concentración de aproximadamente 10 mM \pm 5 mM. En ciertas realizaciones, el pH de una composición es de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7,5, o de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 7, o de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 6,5, o de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6, o de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 5, o es a aproximadamente pH
 65 4,0 \pm 1,0.

En otras realizaciones, las composiciones contienen un agente de ajuste de isotonicidad para hacer que la solución o suspensión sea isotónica y más compatible para inyección. Los ejemplos no limitantes de agentes de isotonicidad incluyen NaCl, dextrosa, glucosa, glicerina, sorbitol, xilitol, y etanol. En ciertas realizaciones, el agente de isotonicidad es NaCl. En ciertas realizaciones, NaCl está en una concentración de aproximadamente 160 ± 20 mM, o aproximadamente $140 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$, o aproximadamente $120 \pm 20 \text{ mM}$, o aproximadamente $100 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$, o aproximadamente $80 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$, o aproximadamente $60 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$.

Además, en otras realizaciones, las composiciones comprenden un conservante. Los conservantes incluyen, pero no se limitan a, m-cresol y alcohol bencílico. En ciertas realizaciones, el conservante está en una concentración de aproximadamente un $0,4 \% \pm 0,2 \%$, o aproximadamente un $1 \% \pm 0,5 \%$, o aproximadamente un $1,5 \% \pm 0,5 \%$, o aproximadamente un $2,0 \% \pm 0,5 \%$.

En otras realizaciones más, las composiciones contienen un antiadsorbente (por ejemplo, para aliviar la adsorción de una variante de CNP a vidrio o plástico). Los antiadsorbentes incluyen, pero no se limitan a, alcohol bencílico, Polisorbato 20, y Polisorbato 80. En ciertas realizaciones, el antiadsorbente está en una concentración de aproximadamente un $0,001 \%$ a aproximadamente un $0,5 \%$, o de aproximadamente un $0,01 \%$ a aproximadamente un $0,5 \%$, o de aproximadamente un $0,1 \%$ a aproximadamente un 1% , o de aproximadamente $0,5 \%$ a aproximadamente 1% , o de aproximadamente un $0,5 \%$ a aproximadamente un $1,5 \%$, o de aproximadamente un $0,5 \%$ a aproximadamente un 2% , o de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 2% .

En realizaciones adicionales, las composiciones comprenden un estabilizante. Los ejemplos no limitantes de estabilizantes incluyen glicerina, glicerol, tioglicerol, metionina, y ácido ascórbico y sales de los mismos. En algunas realizaciones, cuando el estabilizante es tioglicerol o ácido ascórbico o una sal de los mismos, el estabilizante está en una concentración de aproximadamente un $0,1 \%$ a aproximadamente un 1% . En otras realizaciones, cuando el estabilizante es metionina, el estabilizante está en una concentración de aproximadamente un $0,01 \%$ a aproximadamente un $0,5 \%$, o de aproximadamente un $0,01 \%$ a aproximadamente un $0,2 \%$. En otras realizaciones más, cuando el estabilizante es glicerina, el estabilizante está en una concentración de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 100% (puro).

En otras realizaciones, las composiciones contienen un antioxidante. Los antioxidantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, metionina y ácido ascórbico. En ciertas realizaciones, la proporción molar de antioxidante con respecto a la variante de CNP es de aproximadamente $0,1:1$ a aproximadamente $15:1$, o de aproximadamente $1:1$ a aproximadamente $15:1$, o de aproximadamente $0,5:1$ a aproximadamente $10:1$, o de aproximadamente $1:1$ a aproximadamente $10:1$ o de aproximadamente $3:1$ a aproximadamente $10:1$.

En las composiciones se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido mineral (por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, fosfato, sulfato), sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, acetato, propionato, malonato, benzoato, mesilato, tosilato), y sales de aminas (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, dietanolamina). Una discusión minuciosa de sales farmacéuticamente aceptables se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Company, (Easton, Pensilvania (1990)).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en diversas formas, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, pomadas, y parches transdérmicos. Las formas de dosificación de las composiciones se pueden adaptar al modo de administración deseado de las composiciones. Para la administración oral, las composiciones pueden tomar la forma de, por ejemplo, un comprimido o cápsula (incluyendo cápsula de gelatina blanda), o pueden ser, por ejemplo, una solución acuosa o no acuosa, suspensión o jarabe. Los comprimidos y cápsulas para su administración oral pueden incluir uno o más excipientes, diluyentes y vehículos usados habitualmente, tales como manitol, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, almidón de maíz, sacarina sódica, talco, celulosa, carbonato de magnesio y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, estearil fumarato sódico). Si se desea, se pueden añadir agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes a las formulaciones sólidas y líquidas. Otros ingredientes opcionales para las formulaciones orales incluyen, pero no se limitan a, conservantes, agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones orales también pueden tener un revestimiento entérico para proteger la variante de CNP del entorno ácido del estómago. Se conocen métodos de preparación de formas de dosificación sólidas y líquidas, o serán obvios para los expertos en esta materia (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, mencionado anteriormente).

Las formulaciones para administración parenteral se pueden preparar, por ejemplo, como soluciones o suspensiones líquidas, como formas sólidas adecuadas para solubilización o suspensión en un medio líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Por ejemplo, las soluciones y suspensiones inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes diluyentes, vehículos, disolventes (por ejemplo, solución acuosa tamponada, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico), agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes emulgentes, agentes de suspensión adecuados, y similares. Además, se pueden usar aceites no volátiles estériles, ésteres grasos, polioles y/o otros ingredientes inactivos. Como ejemplos adicionales, las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles, que pueden contener

agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las composiciones que comprenden una variante de CNP también pueden ser formulaciones liofilizadas. En ciertas realizaciones, las formulaciones liofilizadas comprenden un tampón y un agente formador de volumen, y opcionalmente un antioxidante. Los tampones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, tampones de acetato y tampones de citrato. Los agentes formadores de volumen a modo de ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, manitol, sacarosa, dextrano, lactosa, trehalosa, y povidona (PVP K24). En ciertas realizaciones, el manitol esta en una cantidad de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 8 %, o de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 6 %. En ciertas realizaciones, la sacarosa está en una cantidad de aproximadamente un 6 % a aproximadamente un 20 %, o de aproximadamente un 6 % a aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 12 %. Los antioxidantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, metionina y ácido ascórbico.

La divulgación también proporciona kits que contienen, por ejemplo, frascos, viales, ampollas, tubos, cartuchos y/o jeringas que comprenden una formulación líquida (por ejemplo, inyectable estéril) o una formulación sólida (por ejemplo, liofilizada). Los kits también pueden contener vehículos o excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolventes, soluciones y/o tampones) para reconstituir una formulación sólida (por ejemplo, liofilizada) en una solución o suspensión para su administración (por ejemplo, by por inyección), que incluye, pero no se limita a, reconstitución de una formulación liofilizada en una jeringa para inyección o para dilución de un concentrado hasta una concentración más baja. Además, las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se pueden preparar a partir de, por ejemplo, polvo estéril, gránulos, o comprimidos que comprenden una composición que contienen CNP. Los kits también pueden incluir dispositivos de distribución, tales como dispositivos de distribución de aerosol o inyección, inyector de bolígrafo, auto inyectores, inyector sin aguja, jeringas, y/o agujas.

Como un ejemplo no limitante, un kit puede incluir jeringas que tengan una cámara individual o una cámara doble. Para jeringas de cámara individual, la cámara individual puede contener una formulación líquida de CNP lista para su inyección, o una formulación sólida de CNP (por ejemplo, liofilizada) o una formulación líquida de una variante de CNP en una cantidad relativamente pequeña de un sistema de disolvente adecuado (por ejemplo, glicerina) que se puede reconstituir en una solución o suspensión para inyección. Para las jeringas de cámara doble, una cámara puede contener un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, sistema de disolvente, solución o tampón), y la otra cámara porque contener una formulación sólida de CNP (por ejemplo, liofilizada) o una formulación líquida de una variante de CNP en una cantidad relativamente pequeño de un sistema de disolvente adecuado (por ejemplo, glicerina) que se puede reconstituir en una solución o suspensión, usando el vehículo fue excipiente de la primera cámara, para inyección.

Como un ejemplo adicional, un kit puede incluir uno o más inyectores de bolígrafo o dispositivos de autoinyección, y cartuchos de cámara doble. Una cámara de un cartucho puede contener un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, sistema de disolvente, solución o tampón) y la otra cámara puede contener una formulación de CNP sólida (por ejemplo, liofilizada) o una formulación líquida de una variante de CNP en una cantidad relativamente pequeña de un sistema de disolvente adecuado (por ejemplo, glicerina) que se puede reconstituir en una solución o suspensión, usando el vehículo o excipiente de la primera cámara, para inyección. Un cartucho puede comprender una cantidad de la variante de CNP que es suficiente para su dosificación durante un periodo de tiempo deseado (por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, etc.). El inyector de bolígrafo o autoinyector se puede ajustar para administrar una cantidad deseada de la formulación de CNP desde un cartucho.

Además, las composiciones farmacéuticas que comprenden una variante de CNP se pueden formular como un sistema de liberación lenta, de liberación controlada o de liberación sostenida para mantener un nivel de dosificación relativamente constante durante un periodo de tiempo deseado, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, o 3 meses. Las formulaciones de liberación lenta, de liberación controlada y de liberación sostenida se pueden preparar usando, por ejemplo, sistemas poliméricos biodegradables (que pueden comprender, por ejemplo, polímeros hidrófilos [por ejemplo, polilactida, poliglicólido, poli(lactida-glicólido)]), y pueden tomar la forma de, por ejemplo, micropartículas, microesferas o liposomas, como se sabe en la técnica.

Dosificaciones y frecuencia de dosificación

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente activo (por ejemplo, una variante de CNP) se refiere a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico a un paciente. La cantidad puede variar de un individuo a otro y puede depender de una serie de factores, incluyendo la condición física general del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de CNP la puede establecer fácilmente un experto en la materia, utilizando materiales y procedimientos disponibles públicamente. Por ejemplo, la cantidad de una variante de CNP usada para terapia debería dar una tasa de crecimiento aceptable basándose en gráficos de crecimiento para niños de 0-17 años con acondroplasia (214 mujeres y 189 hombres), que en eran la altura para la edad, circunferencia de la cabeza, y crecimiento segmentario (Horton WA *et al.*, Standard growth curves for achondroplasia, J. Pediatr., 93: 435-8 (1978)). Los gráficos de CDC se pueden usar para evaluar el peso para la edad y el peso para la altura o IMC para la edad. También se pueden medir los resultados secundarios con

cursos que tienen una naturaleza más crónica más.

Teniendo una semivida más larga en suero que el CNP22 de tipo silvestre, las variantes de CNP se pueden administrar de forma potencial con menos frecuencia que CNP22. La frecuencia de dosificación para un individuo en particular puede variar dependiendo de diversos factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la afección y la respuesta del individuo a la terapia. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que contiene una variante de CNP se administra a un sujeto aproximadamente una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, o una vez a la semana. En una realización, para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, displasias esqueléticas, incluyendo acondroplasia), se administra una dosis diaria o semanal de una variante de CNP a pacientes hasta y/o a través de la edad adulta.

Las variantes de CNP que se describen en el presente documento se pueden administrar a pacientes a dosis terapéuticamente eficaces para tratar, mejorar o prevenir trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, displasias esqueléticas, incluyendo acondroplasia) y afecciones (por ejemplo, trastornos del músculo liso vascular) en las que el CNP puede proporcionar un efecto vasoprotector. La seguridad y la eficacia terapéutica de las variantes de CNP se pueden determinar mediante procedimientos farmacológicos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, tal como, por ejemplo, determinando la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción de DL_{50}/DE_{50} . Normalmente se prefieren agentes activos que presenten un índice terapéutico grande.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación normalmente se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE_{50} , con poca o mínima toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación usada y de la vía de administración usada. La dosis terapéuticamente eficaz se puede determinar a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales.

En ciertas realizaciones, las variantes de CNP que se describen en el presente documento se administran a una dosis en el intervalo de aproximadamente 5 o 10 nmol/kg a aproximadamente 300 nmol/kg, o de aproximadamente 20 nmol/kg a aproximadamente 200 nmol/kg. En algunas realizaciones, las variantes de CNP se administran a una dosis de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 175, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 nmol/kg u otra dosis que el médico que trata considere apropiada. En otras realizaciones, las variantes de CNP se administran a una dosis de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 4,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg/kg, u otra dosis que el médico que trata considere apropiada. Las dosis de las variantes de CNP que se describen en el presente documento se pueden administrar de acuerdo con la frecuencia de dosificación/frecuencia de administración que se describen en el presente documento, que incluye, pero no se limita a diariamente, 2 o 3 veces a la semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc.

La frecuencia de la dosificación/administración de una variante de CNP para un sujeto en particular puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la afección y respuesta del sujeto a la terapia. La variante de CNP se puede administrar en una sola dosis o en múltiples dosis por dosificación. En ciertas realizaciones, la dosis de CNP se administra, en una sola dosis o en múltiples dosis, diariamente, cada dos días, cada 3 días, 2 veces a la semana, 3 veces a la semana, semanalmente, quincenalmente, cada 3 semanas, mensualmente, cada 6 semanas, cada 2 meses, cada 3 meses, o según lo considere apropiado el médico que trata.

En algunas realizaciones, se administra una variante de CNP para permitir periodos de crecimiento (por ejemplo, condrogénesis), seguidos de un periodo de recuperación (por ejemplo, osteogénesis). Por ejemplo, la variante de CNP se puede administrar por vía intravenosa, por vía subcutánea o mediante cualquier otra vía diariamente o múltiples veces a la semana durante un periodo de tiempo, seguido de un periodo sin tratamiento, y a continuación el ciclo se repite. En algunas realizaciones, el periodo de tratamiento inicial es de 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas o 12 semanas. En una realización relacionada, el periodo sin tratamiento dura 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En ciertas realizaciones, el régimen de dosificación de la variante de CNP es diario durante 3 días seguido de 3 días de descanso; o diario o múltiples veces a la semana durante 1 semana seguido de 3 días o 1 semana de descanso; O diario o múltiples veces a la semana durante 2 semanas seguido de 1 o 2 semanas de descanso; O diario o múltiples veces por semana durante 3 semanas seguido de 1, 2 o 3 semanas de descanso; O diario o múltiples veces a la semana durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas seguido de 1, 2, 3 o 4 semanas de descanso.

Modos de Administración

Las variantes de CNP, o composiciones farmacéuticas que las comprenden, se pueden administrar a sujetos de diversas maneras, por ejemplo mediante inyección por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por

vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intradérmica o por vía intratecal. En una realización, las variantes de CNP se administran mediante una sola inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o intratecal una vez al día.

5 Las variantes de CNP también se pueden administrar por inyección directa en o cerca del sitio de la enfermedad. Además, las variantes de CNP se pueden administrar mediante la implantación de un depósito en el sitio de acción diana (por ejemplo, un hueso anómalo o displásico). Como alternativa, las variantes de CNP se pueden administrar por vía sublingual bajo la lengua (por ejemplo, comprimido sublingual) o por inhalación en los pulmones (por ejemplo, inhalador o pulverización de aerosol), por administración en la cavidad nasal (por ejemplo, pulverización intranasal), por administración en el ojo (por ejemplo, gota ocular), o por administración transdérmica (por ejemplo, por medio de un parche sobre la piel). Las variantes de CNP también se pueden administrar por vía oral en forma de microesferas, microcápsulas, liposomas (no cargados o cargados (por ejemplo, catiónicos)), micropartículas poliméricas (por ejemplo, poliamidas, polilactida, poliglicólido, poli(lactida-glicólido)), microemulsiones, y similares.

10
15 Un método adicional de administración es mediante bomba osmótica (por ejemplo, una bomba Alzet) o mini-bomba (por ejemplo, una bomba mini-osmótica Alzet), que permite una administración controlada y continua controlado y continuo y/o de liberación lenta de la variante de CNP o composición farmacéutica durante un periodo predeterminado. La bomba o mini-bomba osmótica se puede implantar por vía subcutánea o cerca del sitio diana (por ejemplo, los huesos largos de las extremidades, las epífisis, etc.).

20 Como se ha explicado anteriormente, las variantes de CNP se pueden usar para tratar afecciones o enfermedades causadas por el crecimiento anómalo de las células del músculo liso vascular, que incluye, pero no se limita a, reestenosis y arteriosclerosis. Para la administración local de una variante de CNP al vaso sanguíneo corporal enfermo, la variante de CNP se puede administrar por medio de un dispositivo médico (por ejemplo, una endoprótesis vascular) implantado en el sitio enfermo. En una realización, la variante de CNP está impregnada en una matriz polimérica o revestimiento polimérico colocado sobre una endoprótesis vascular. En otra realización, la variante de CNP está contenida en depósitos o canales formados en el cuerpo de una endoprótesis vascular y cubiertos por una membrana o capa polimérica porosa a través de la cual la variante de CNP se puede difundir. La matriz, revestimiento, membrana o capa polimérica puede comprender al menos un polímero biodegradable (por ejemplo, hidroxilo), tal como se sabe en la técnica. En una realización más, la variante de CNP puede estar contenida en microporos en el cuerpo de una endoprótesis vascular. La variante de CNP se puede administrar desde una endoprótesis vascular por liberación de estallidos, liberación de pulso, liberación controlada o liberación sostenida, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la endoprótesis vascular puede administrar la variante de CNP de forma local al sitio enfermo en una liberación de estallido seguida de una liberación sostenida. La liberación sostenida puede ser durante un periodo de aproximadamente 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o 1 año.

25
30
35 Para un experto en la materia será evidente que las variantes de CNP o composiciones de las mismas también se pueden administrar por otros modos. La determinación del modo de administración más eficaz de las variantes de CNP o composiciones de las mismas está dentro de la habilidad del experto en la materia.

40 Las variantes de CNP se pueden administrar como formulaciones farmacéuticas adecuadas para, por ejemplo, administración por vía oral (incluyendo bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa), o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. Dependiendo del modo de administración pretendido, las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar como formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, lociones y similares. Las formulaciones se pueden proporcionar en una forma de dosificación unitaria adecuada para administración única de una dosificación precisa. Las formulaciones comprenden una cantidad eficaz de una variante de CNP, y uno o más excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente uno o más de otros agentes biológicamente activos.

Terapia de combinación

45
50
55 En una realización, una variante de CNP se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes activos útiles para tratar, mejorar o prevenir afecciones o trastornos sensibles a CNP tales como, por ejemplo, trastornos relacionados con los huesos (por ejemplo, displasias esqueléticas) y trastornos del músculo liso vascular. El o los otros agentes activos pueden aumentar los efectos de la variante de CNP y/o ejercer otros efectos farmacológicos además de los de la variante de CNP. Los ejemplos no limitantes de agentes activos que se pueden usar en combinación con las variantes de CNP que se describen en el presente documento son otros péptidos natriuréticos (por ejemplo, BNP) e inhibidores (por ejemplo, antagonistas) de peptidasas y proteasas (por ejemplo, NEP y furina), NPR-C y tirosina quinasas (por ejemplo, FGFR-3). Al prevenir la escisión con NEP de la variante de CNP, un inhibidor de NEP puede prolongar la semivida de la variante. Los ejemplos de inhibidores de NEP incluyen, pero no se limitan a, tirofano y candoxatril. El co-uso de un inhibidor de NPR-C también puede prolongar la semivida de la variante de CNP a través de la inhibición de la eliminación de la variante por NPR-C. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de NPR-C es el fragmento FGIPMDRIGNR (SEQ ID NO: 82), que se podría liberar al sitio diana (por

ejemplo, placa de crecimiento óseo) después de la escisión proteolítica de la quimera de FGIPMDRIGNPR-CNP22 (Análogo CZ) (SEQ ID NO: 82) o quimeras similares que comprenden variantes de CNP22 (por ejemplo, las que contienen sustitución(es), adición(es), y/o delección(es) de aminoácidos con respecto a CNP22). El co-uso de un inhibidor de tirosina quinasa puede acentuar los efectos de una terapia de CNP inhibiendo el receptor FGFR-3 de tirosina quinasa, un regulador negativo de condrocitos y crecimiento óseo. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de tirosina quinasa incluyen los que se desvelan en los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 6.329.375 y 6.344.459.

Para conseguir el resultado terapéutico adecuado en las terapias de combinación, por lo general se podría administrar al sujeto la composición de CNP y otro u otros agentes terapéuticos en una cantidad combinada eficaz para producir el resultado terapéutico deseado (por ejemplo, restablecimiento del crecimiento óseo). Este proceso puede implicar la administración de la composición de CNP y otro u otros agentes terapéuticos al mismo tiempo. La administración simultánea se puede conseguir administrando una formulación de una sola composición o una formulación de proteína farmacológica que incluya tanto la variante de CNP como otro u otros agentes terapéuticos. Como alternativa, el otro u otros agentes s terapéuticos se pueden tomar por separado al mismo tiempo que una formulación farmacológica (por ejemplo, comprimido, inyección o bebida) de la variante de CNP. La variante de CNP también se puede formular en un producto alimenticio como brownies, tortitas, o pastel, adecuados para su ingestión.

En otras alternativas, la administración de la variante de CNP puede preceder o seguir a la administración del otro u otros agentes terapéuticos (mediante intervalos que varían de minutos a horas. En realizaciones en las que el otro agente o agentes terapéuticos y la composición de CNP se administran por separado, por lo general se podría asegurar que la variante de CNP y el otro agente o agentes terapéuticos se administran dentro de un periodo de tiempo apropiado entre sí de modo que tanto la variante de CNP como el otro u otros agentes terapéuticos pueden ejercer, de forma sinérgica o aditiva, un efecto beneficioso en el paciente. Por ejemplo, la composición de CNP se puede administrar en aproximadamente 0,5-6 horas (antes o después) de del otro u otros agentes terapéuticos. En una realización, la composición de CNP se administra dentro de aproximadamente 1 hora (antes o después) del otro u otros agentes terapéuticos.

Identificación y seguimiento de poblaciones de pacientes

Para identificar sujetos adecuados para la terapia con CNP y para determinar si un paciente dado es sensible a la terapia con CNP se pueden establecer protocolos. Por ejemplo, para el tratamiento de trastornos relacionados con los huesos, se pueden medir indicadores de crecimiento, tales como mediciones de crecimiento de hueso largo *in utero* y neonatal y mediciones de biomarcadores de crecimiento óseo tales como CNP, cGMP, Colágeno II, osteocalcina y Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA).

Un marcador de señalización de CNP es cGMP (monofosfato de guanosina 3',5' cíclico). El nivel de esta molécula de señalización intracelular aumenta después de que CNP se una y active su receptor NPR-B afín. Los niveles elevados de cGMP se pueden medir a partir de extractos de cultivos celulares (*in vitro*) después de la exposición a CNP, medios acondicionados de estudios de explantes de huesos (*ex vivo*) después de la exposición a CNP, y en plasma (*in vivo*) dentro de minutos de la administración de CNP por vía subcutánea, por vía intravenosa, a través de otras vías de administración conocidas en la técnica.

Los analitos específicos de cartílago y de hueso (o marcadores asociados con cartílago y hueso) también se pueden medir para evaluar la eficacia de CNP. Por ejemplo, los fragmentos de colágeno de tipo II escindido son un marcador específico de cartílago para la renovación del cartílago. El colágeno de tipo II es el componente orgánico principal del cartílago y los fragmentos de colágeno de tipo II (colágeno escindido) se liberan en circulación, y posteriormente se secretan en la orina, después de la renovación del cartílago. La renovación del cartílago precede a la formación de hueso nuevo.

Un biomarcador específico de hueso para la formación ósea que se puede medir son los propéptidos N-terminales del procolágeno de tipo I (PINP). La síntesis del colágeno de tipo I es una etapa importante en la formación de hueso, ya que el colágeno de tipo I es el principal componente orgánico en la matriz ósea. Durante la síntesis del colágeno, los propéptidos s se liberan de la molécula de procolágeno y se pueden detectar en el suero. Además, los fragmentos de colágeno de tipo I se pueden medir como un marcador para la resorción ósea.

Otros biomarcadores potenciales para el cartílago y la formación ósea y el crecimiento incluyen sulfato de agregano y condroitina (marcador específico de cartílago para la renovación del cartílago), propéptidos del colágeno de tipo II (marcador específico de cartílago para la formación del cartílago), fosfatasa alcalina (específica de hueso) y osteocalcina para la formación de hueso). Los biomarcadores asociados a cartílago y hueso se pueden medir, por ejemplo, en suero a partir de estudios de eficacia/farmacodinámicos *in vivo* y a partir de los medios acondicionados de estudios *ex vivo*, usando kits disponibles en el mercado.

En una realización, el nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago se somete a ensayo se mide en un sujeto al que se le ha administrado una variante de CNP con el fin de controlar los efectos de la variante de

CNP en la formación y crecimiento de hueso y cartílago *in vivo*. Por ejemplo, un aumento en el nivel de al menos un biomarcador asociado a hueso o cartílago puede indicar que la administración de una variante de CNP tiene un efecto positivo en el crecimiento óseo y es un tratamiento útil para displasias esqueléticas y otras enfermedades o trastornos relacionados con los huesos o cartílagos con disminución de la actividad de CNP. Los ejemplos de biomarcadores asociados de hueso o cartílago incluyen, pero no se limitan a, CNP (por ejemplo, niveles endógenos de CNP), cGMP, propéptidos de colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo II y fragmentos de los mismos, osteocalcina, antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), propéptidos de procolágeno de tipo I (PINP) y fragmentos de los mismos, colágeno de tipo I y fragmentos de los mismos, sulfato de agregano y condroitina y fosfatasa alcalina.

En una realización, los biomarcadores se miden al obtener una muestra biológica de un sujeto al que se le administrará, se le está administrando o se le ha administrado una variante de CNP. Los biomarcadores se pueden medir usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, transferencia de Western, ensayos de inmunoabsorción relacionados con enzimas (ELISA) y ensayo de actividad enzimática. La muestra biológica puede ser sangre, suero, orina u otros fluidos biológicos.

Los aspectos adicionales y los detalles de la divulgación serán evidentes a partir de los ejemplos que siguen a continuación, que pretenden ser ilustrativos.

F. Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de Variantes de CNP

Las variantes de CNP se prepararon usando los métodos que se describen en el presente documento. Se realizaron sustituciones con aminoácidos o peptidomiméticos naturales o no naturales, como se indica en las Tablas 1-3 (mostradas en el Ejemplo 3), en los respectivos restos de aminoácidos en la secuencia de CNP22 de tipo silvestre. En ciertas variantes, se añadieron aminoácidos adicionales a los extremos N-terminales y/o C-terminales de toda o una parte de la secuencia de CNP22 de tipo silvestre (véase la Tabla 3).

También se prepararon variantes de CNP en las que un resto de PEG (o PEO) se conjugó con el extremo N-terminal de CNP22 o variantes del mismo (véase la Tabla 4, mostrada en el Ejemplo 3). Los reactivos de PEGilación se pueden obtener a partir de las fuentes comerciales que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Proveedor	Nombre del Producto	Nombre	PM (Da)	Reactivo de PEGilación
NOF	Sunbright ME-200CS	mPEG20K	20.000	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₄₅ -(CH ₂) ₅ COO-NHS
NOF	Sunbright ME-050CS	mPEG5K	5.000	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₁₁ 0-(CH ₂) ₅ COO-NHS
Pierce	Ester de (Metil-PEG12)3-PEG4-NHS	(mPEG12)3-PEG4	2.400	[CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₁₂] ₃ -(CH ₂ CH ₂ O) ₄ -NHC(O)(CH ₂) ₃ -COO-NHS
NOF	Sunbright ME-020HS	mPEG2K	2.000	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₄₅ -(CH ₂) ₅ COO-NHS
NOF	Sunbright ME-020CS	mPEG2K	2.000	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₄₅ -(CH ₂) ₅ COO-NHS
NOF	Sunbright ME-010HS	mPEG1K	1.000	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₂₃ -CO(CH ₂) ₂ COO-NHS
Pierce	Ester de Metil PEG24-NHS	MS(PEG)24	1.200	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₂₄ -(CH ₂) ₂ COO-NHS
Pierce	NHS-PEG12-Biotina con unión en EZ	PEO12-Biotina	940	Biotin-(CH ₂ CH ₂ O) ₁₂ -(CH ₂) ₂ COO-NHS
Pierce	Ester de PEG12-NHS	MS(PEG)12	690	CH ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ₁₂ -(CH ₂) ₂ COO-NHS
Pierce	NHS-PEG4-Biotina con unión en EZ	PE04-biotina	590	Biotin-(CH ₂ CH ₂ O) ₄ -(CH ₂) ₂ COO-NHS
Pierce	Mono(succinimidil)suberato de mono(lactosilamido)	LSS	580	
Pierce	NHS-LC-LC-Biotina con unión en EZ	LC-LC-Biotina	570	
Pierce	NHS-LC-Biotina con unión en EZ	LC-Biotina (LC = cadena larga)	450	
Pierce	NHS-Biotina con unión en EZ	Biotina	340	

Los polímeros de PEG (también denominados PEO) adquiridos en Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois) son monodispersos - es decir, contienen un solo polímero separado de un peso molecular en particular. Por el contrario, los polímeros de PEG adquiridos en NOF (Nippon Oil and Fat) son polidispersos - es decir, contienen una mezcla de polímeros que tienen una distribución de pesos moleculares.

5 Para PEGilar el CNP22 o variantes del mismo, las condiciones de reacción y purificación se optimizan para cada conjugado de PEG-CNP. De acuerdo con un procedimiento general de PEGilación, las mezclas de reacción contienen aproximadamente 1 mM de CNP22 o una variante del mismo, y de aproximadamente 1 a 5 mM de PEG
10 activado con NHS en tampón de fosfato potásico, pH entre aproximadamente 4,0 y 6,4. Para mono-PEGilar de forma selectiva en el extremo N-terminal del péptido y minimizar la PEGilación en un sitio interno (por ejemplo, Lys4 de CNP22), la reacción de PEGilación se puede realizar en condiciones más ácidas (por ejemplo, a un pH entre aproximadamente 4,5 y 6,5) para protonar de forma selectiva y por lo tanto desactivar el grupo amino primario más
15 básico en la cadena lateral de lisina. Después de aproximadamente 1 a 3 horas de incubación a temperatura ambiente, la reacción de PEGilación se interrumpe mediante la adición de tampón acuoso de glicina. A continuación, los productos de reacción se separan por HPLC en fase inversa, optimizados para cada conjugado de PEG-CNP. Las muestras de fraccionamiento se tratan en Speedvac a sequedad, y se reconstituyen/ formulan en HCl 1 mM. La identificación y la pureza de cada producto de PEG-CNP se determina por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS).

20 Ejemplo 2A

Producción recombinante de variantes de CNP

25 Las variantes de CNP se pueden producir usando tecnología recombinante. En ciertas realizaciones, las variantes de CNP se producen como proteínas de fusión que comprenden péptido, proteína vehículo o etiqueta que se puede escindir. A continuación se desvelan métodos a modo de ejemplo para producir de forma recombinante proteínas de fusión de CNP.

30 Materiales y Métodos

Clonación de proteínas de fusión de CNP en vectores de expresión

35 Los fragmentos de ADN de CNP se amplificaron usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos de PCR amplificados digirieron con Nde I y BamHI y se clonaron en vector pET21a (Novagen, Gibbstown, New Jersey). El ADN de la proteína de fusión de CNP se sintetizó por DNA2.0 y se clonó en vectores de expresión diferentes (Tabla 6).

Tabla 6

Construcción	Vector	Producto	Escisión química	Producto final	Cepa de <i>E. coli</i> de expresión
pJexpress-TAF-CNP	pJexpress401	Cuerpos de inclusión de TAF-CNP	Ácido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21; BL21(DE3)
pjexpress-KSI-CNP(M/N)	pJexpress404	Cuerpos de inclusión de KSI-CNP(M/N)	CNBr (Met-X)	CNP(M/N)	BL21
pET-31b-KSI-CNP	pET-31b	Cuerpos de inclusión de KSI-CNP	Ácido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)
pET-32a-Trx-CNP	pET-32a	Proteína de fusión de Trx-CNP (soluble)	Ácido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)
pMAL-CNP	pMAL-c2X	Proteína de fusión de MBP-CNP (soluble)	Ácido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)
CNP: GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQSMGLGC [Gly-CNP37 (SEQ ID NO: 75)]; TAF: factor TAF12 de transcripción humano; KSI: cetosteroido isomerasa; MBP: proteína de unión a maltosa; Trx: tiorredoxina					

40 Expresión de proteínas de fusión de CNP en *E. coli*

45 Los plásmidos de expresión de proteína de fusión de CNP se transformaron en BL21 o BL21(DE3) de *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB que contenían 100 ug/ml de carbenicilina o 50 ug/ml de kanamicina y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se seleccionó una sola colonia y se cultivó en 4 ml de medio de LB que contenía 100 ug/ml de carbenicilina o 50 ug/ml de kanamicina a 37 °C con agitación. Cuando una DO₆₀₀ de cultivo bacteriano alcanzó 0,6, se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG) a los medios celulares

y los medios se incubaron a 37 °C durante 3 horas con agitación. Para la recolección celular, las células bacterianas se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C. Los sedimentos celulares se lisaron con el Reactivo de Extracción Bacteriana B-PER II (PIERCE, 0,4 ml por 4 ml de de cultivo bacteriano) y la nucleasa Benzonase (Novagen, 0,025 U/ml) a temperatura ambiente durante 10 minutos. El extracto bacteriano en bruto se reservó y se centrifugó para obtener el sobrenadante. El sobrenadante y el extracto en bruto se sometieron a ensayo para la expresión y solubilidad de la proteína de fusión de CNP mediante SDS-PAGE y transferencia de Western.

Detección de la expresión de proteína de fusión de CNP con SDS-PAGE y transferencia de Western

Diez ul de lisados celulares o sobrenadantes solubles se desarrollaron en electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilimida (SDS-PAGE) (Invitrogen, Carlsbad, California, Gel de Bis-tris al 4-12 % de NuPAGE, tampón de MES SDS). El gel se tiñó usando 20 ml de Colorante de Proteína Imperial (Thermo Fisher, Rockford, Illinois) a temperatura ambiente durante 1 hora y se destiñó con agua. Para la transferencia de Western, la proteína se transfirió a la membrana con transferencia en Gel (Invitrogen). La membrana se bloqueó en tampón TBS con leche al 5 % a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo anti-CNP22 de conejo (dilución a 1:2500) (Bachem, Torrance, California) se añadió a la membrana, que a continuación se incubó una temperatura ambiente con agitación durante 2 horas, y a continuación la membrana se lavó 3 veces con tampón TBS.

La IgG anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (AP) (dilución a 1:5000) se añadió a la membrana, que a continuación se incubó una temperatura ambiente con agitación durante 1 hora, y a continuación la membrana se lavó 3 veces con tampón TBS. Se añadieron diez ml de Sustrato Estabilizado WESTERN BLUE® (Promega, Madison, Wisconsin) a la membrana, que a continuación se incubó a temperatura ambiente con agitación de 1 a 5 min, y a continuación la membrana se lavó con tampón TBS para eliminar el exceso de colorante.

Expresión de la proteína de fusión de TAF-CNP en *BL21* de *E. coli*

Las células (cepa BL21 de *E. coli*) que expresan la proteína de fusión de TAF-CNP se obtuvieron a partir de la solución de reserva de glicerol almacenada a -80 °C y se cultivaron en 4 ml de medio LB que contenía 50 ug/ml de kanamicina a 37 °C durante una noche con agitación (250 rpm). Cuatro ml de cultivo celular que crece durante una noche se transfirió a 200 ml de medio LB que contenía 50 ug/ml de kanamicina y se cultivó a 37 °C con agitación (250 rpm). Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,6, a continuación se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína a 37 °C con agitación (250 rpm) durante 3 horas. A continuación, las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y el sedimento celular resultante se congeló a -80 °C.

Purificación de cuerpos de inclusión de TAF-CNP y escisión con ácido fórmico

El sedimento celular (de 200 ml de cultivo) se volvió a suspender en 25 ml de tampón B-PER II (PIERCE), el sedimento se sonicó durante 10 minutos (50 %, 1 segundo, pausa de 2 segundos) sobre hielo, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, y a continuación el sedimento se volvió a suspender en 25 ml de tampón B-PER II diluido 20x. Esto se repitió hasta que el sobrenadante se volvió transparente (3-5 veces). Un ml de los cuerpos de inclusión de TAF-CNP resuspendidos se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se disolvió con 10 ul de un 88 % de ácido fórmico, y a continuación se añadieron inmediatamente 490 ul de agua filtrada de Millipore. El sedimento se mezcló bien mediante agitación vorticial y se incubó a 55 °C de 20 a 24 horas (70 °C/6 horas son condiciones alternativas). Los productos de la escisión con ácido fórmico se sometieron a ensayo mediante SDS-PAGE y LC/MS(C4RP).

Preparación de la muestra de LC/MS

Los cuerpos de inclusión se aislaron de aproximadamente 8 ml de cultivo (aproximadamente 1,5 de DO) y el sedimento se solubilizó en 10 ul de formiato puro. El sedimento resolubilizado se diluyó inmediatamente hasta una concentración final de formiato de un 2 % o un 10 % (0,5 ml) y se incubó a 55 °C durante 21 horas (pH 2) (la turbidez era más evidente en la muestra de formiato al 2 % al día siguiente). Ambas muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 2 minutos. Veinte ul de sobrenadante se inyectaron en un aparato de LC/MS (C4 RP).

Resultados

Las proteínas de fusión CNP se expresaron en *E. coli*

Todas las proteínas de fusión de CNP se expresaron en *E. coli* inducida con IPTG 1 mM a 37 °C durante 3 horas (Figura 1). Las construcciones pJexpress-TAF-CNP, pJexpress-KSI-CNP(M/N) y pET-31b-KSI-CNP se expresaron como cuerpos de inclusión, mientras que las construcciones pET-32a-Trx-CNP y pMAL-CNP se expresaron como proteínas de fusión solubles. La transferencia de Western usando anticuerpo anti-CNP22 confirmó la expresión de las proteínas de fusión de CNP (Figura 1).

El CNP se produjo a partir de cuerpos de inclusión de TAF-CNP mediante escisión con ácido fórmico

Los cuerpos de inclusión de TAF-CNP se purificaron parcialmente y se trataron con un 2 % de ácido fórmico a 55 °C de 20 a 24 horas (las condiciones alternativas son 70 °C/6 horas). La mayor parte del TAF-CNP se escindió y en SDS-PAGE (Figura 2) apareció una banda extra con un tamaño similar al del péptido Gly-CNP37. La muestra escindida se analizó adicionalmente por LC/MS(C4 RP). Los resultados de LC/MS mostraban que el CNP se liberaba en forma soluble a partir de cuerpos de inclusión de TAF-CNP después de escisión con ácido fórmico. El análisis de LC/MS indicaba que la escisión con ácido fórmico de las proteínas de fusión a CNP daba como resultado la formación de Pro-Gly-CNP37 ciclado (PM = 4102). El cálculo de las cantidades de proteína basándose en el análisis sugerían que se producían aproximadamente 60 ug de CNP generado con ácido fórmico a partir de 8 ml de cultivo de DO muy baja. A partir de una escala pequeña (por ejemplo, aproximadamente 8 ml) de cultivo celular de DO baja (por ejemplo, 1,2 de DO), se producían aproximadamente 8 ug/ml de CNP, es que la fermentación de un cultivo celular de DO más elevada (por ejemplo, 38 de DO) a mayor escala (por ejemplo, aproximadamente 8 l) de producir aproximadamente 1 mg/ml de CNP.

5

10

15 **Conclusión**

Se generaron cinco construcciones de expresión para expresar proteínas de fusión a CNP. La expresión de las cinco construcciones producía proteínas de fusión a CNP solubles (Trx y MBP) o insolubles (TAF y KSI). A partir de cuerpos de inclusión de TAF-CNP se puede producir aproximadamente 1 mg/ml de CNP soluble con un procedimiento sencillo de escisión con ácido fórmico.

20

Ejemplo 2B

Producción de variantes adicionales de CNP en *E. coli*

25

La producción recombinante de variantes de CNP se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 2A. En este ejemplo, se generaron construcciones adicionales de CNP con un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II XL (Stratagene) o se sintetizaron con DNA2.0. Las construcciones y vectores de expresión de CNP adicionales se enumeran en la Tabla 7.

30

Tabla 7

Construcción	Vector	Producto	Escisión química	Producto final	Cepa de E. coli de expresión
pJexpress-TAF (C/A)-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A)-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (4D/4E)-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (4D/4E)-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21 (DE3)
pJexpress-BMP-Pro-CNP38	pJexpress401	cuerpos de inclusión de BMP-Pro-CNP38	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21, BL21 (DE3)
pJexpress-TAF-Pro-CNP37	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP37	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP37	BL21, BL21 (DE3)
pJexpress-BMP-Pro-CNP37	pJexpress401	cuerpos de inclusión de BMP-Pro-CNP37	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP37	BL21, BL21 (DE3)
pJexpress-TAF-Pro-HSA-CNP	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF-Pro-HSA-CNP	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-HSA-CNP	BL21
pJexpress-TAF	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-BMP	pJexpress401	cuerpos de inclusión de BMP	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (C/A)	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A)	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (4D/4E)	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (4D/4E)	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (C/A y 4D/4E)	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A y 4D/4E)	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF (C/A y 10D/10E)	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF (C/A y 10D/10E)	N/D	N/D	BL21 (DE3)
pJexpress-TAF-NL-(C/A y 6D/6E)	pJexpress401	cuerpos de inclusión de TAF-NL-(C/A y 6D/6E)	N/D	N/D	BL21 (DE3)

Construcción	Vector	Producto	Escisión química	Producto final	Cepa de E. coli de expresión
pJexpress-TAF-Pro-CNP53	pJexpress401	productos de inclusión de TAF-Pro-CNP53	Acido fórmico (Asp-Pro)	Pro-CNP53	BL21(DE3)
pJexpress-TAF-CNP34	pJexpress401	productos de inclusión de TAF-CNP34	Acido fórmico (Asp-Pro)	CNP34	BL21(DE3)
<p>CNP38: GQEHFNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG [Gly-CNP37 (SEQ ID NO: 75)]; Pro-CNP38: PGQEHFNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG [Pro-Gly-CNP37] (SEQ ID NO: 145); CNP37: QEHFNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG (SEQ ID NO: 60); HSA-CNP: GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG [HSA-CNP27 (SEQ ID NO: 144)]; Pro-CNP53: PDLRVDTKSRAAWARLLQEHFNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG (SEQ ID NO: 185); CNP34: PNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG (SEQ ID NO: 163); TAF-Pro-CNP38: MVLTKKQLDLYREYCPNEQLDEDEVEEMLLQIADDFIESVYTAACQLARHRKSSSTLEVKDVQLHLERQWNMWMIMGSSHHHHSSGLYPRGSHHT- GDDDDKHMDPGQEHFNARYKYGANKKGLSKGCFGLKLDRISSMSGGCG (SEQ ID NO: 196); TAF: factor TAF12 de transcripción humano dominio de plegamiento de histona (HFD) y conector a partir del vector pET-15b; TAF-NL: TAF12 HFD sin un conector; TAF12 HFD: VLTKKQLDLYREYCPNEQLDEDEVEEMLLQIADDFIESVYTAACQLARHRKSSSTLEVKDVQLHLERQWNMWM (SEQ ID NO: 197); conector pET-15b: MGSSHHHHSSGLYPRGSHHTGDDDDKHMD (SEQ ID NO: 195); TAF(C/A): la cisteína en TAF se cambia por alanina; TAF(D/E): el ácido aspártico en TAF se cambia por ácido glutámico (el número indica que resto de aminoácido se cambia); TAF(C/A y D/E): cisteína y ácido aspártico en TAF se cambian por alanina y ácido glutámico, respectivamente; BMP: proteína 2 morfogenética ósea con siete mutaciones de C/A (cisteína a alanina); KSI: cetosteroido isomerasa; MBP: proteína de unión a maltosa; TRX: tioredoxina</p>					

Resultados

Todas las proteínas de fusión de CNP se expresaron en *E. coli* inducida con IPTG 1 mM a 37 °C durante 3 horas. Las construcciones pJexpress-BMP-Pro-CNP38, pJexpress-TAF-Pro-CNP37, pJexpress-BMP-Pro-CNP37, pJexpress-Pro-HSA-CNP, pJexpress-TAF y pJexpress-BMP se expresaron como cuerpos de inclusión. Una transferencia de Western con anticuerpo anti-CNP se usó para confirmar la expresión (Figura 3).

Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") se produjo a partir de cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 mediante escisión con ácido fórmico

El ácido fórmico se usa como un agente desnaturizante para proteínas de cuerpo de inclusión y puede escindir de forma específica el enlace peptídico entre Asp y Pro en condiciones optimizadas. Los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP se purificaron parcialmente como se ha descrito anteriormente y se trataron con un 50 % de ácido fórmico a 25 °C, 37 °C, 42 °C y 55 °C durante 24 horas. La mayor parte del AF-Pro-CNP38 se escindió y una banda de extra con un tamaño similar al del péptido Gly-CNP37 ("CNP38") se mostró en SDS-PAGE a partir de las escisiones a 37 °C, 42 °C y 55 °C (Figura 4A). Las reacciones de escisión a 37 °C y 55 °C se neutralizaron con NaOH 10 M y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos. El TAF-Pro-CNP38 no escindido, TAF y otros cuerpos de inclusión precipitaron en los sedimentos. Los sobrenadantes contenían el Pro-CNP38 soluble y se analizaron adicionalmente por LC/MS. El resultado de LC/MS mostraba que los sobrenadantes contenían una mezcla de péptidos escindidos no específicos generados por un exceso de hidrólisis ácida.

Cuando los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP se trataron con un 2 % y un 10 % de ácido fórmico a 55 °C durante 20 horas, la mayor parte de TAF-Pro-CNP38 se escindió y se observó una banda extra con un tamaño similar al de Gly-CNP37 en SDS-PAGE (Figura 4B). La muestra escindida se analizó adicionalmente por LC/MS. El análisis de LC/MS mostraba que el Pro-CNP38 correcto se liberaba en forma soluble a partir de cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 después de escisión con ácido fórmico. Los rendimientos de Pro-CNP38 a partir de las escisiones con un 2 % y un 10 % de ácido fórmico eran similar (Figura 4C).

Escisión con ácido fórmico y neutralización para producción y purificación de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")

El ácido fórmico puede disolver y escindir TAF-Pro-CNP38, BMP-Pro-CNP38 y otros cuerpos de inclusión. El pH de neutralización da como resultado la precipitación de proteínas/péptidos contaminantes insolubles (TAF-Pro-CNP38 y BMP-Pro-CNP38 sin escindir, TAF, BMP y otros). El Pro-CNP38 soluble permanece en el sobrenadante después de centrifugación. TAF-Pro-CNP38 y BMP-Pro-CNP38 se escindieron en un 2 % de ácido fórmico a 55 °C o 70 °C durante 24 horas. Las reacciones de escisión se neutralizaron con una proporción de 1:1 de tampón Tris 0,5 M y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos. Los resultados mostraban que los sobrenadantes contenían péptidos casi puros y no se observó pérdida de recuperación de Pro-CNP38 después de neutralización. Se trata de una etapa sencilla y eficaz para la purificación de Pro-CNP38.

Análisis de condiciones variables para escisión con ácido fórmico de cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 para producción de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")

El ácido fórmico puede escindir de forma específica el enlace peptídico entre Asp y Pro en condiciones optimizadas. La escisión no específica de enlaces peptídicos entre Asp y cualquier otro aminoácido o incluso la escisión no específica de cualquier enlace peptídico se puede producir si no se optimizan las condiciones de escisión con ácido fórmico. Los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 se escindieron con un 2 % de ácido fórmico a 42 °C, 55 °C o 70 °C durante 6, 24 o 48 horas. La Figura 5A muestra que TAF-Pro-CNP38 se extinguía completamente a 70 °C durante 24 horas o a 55 °C durante 48 horas. La escisión a 70 °C se pudo completar en 17 horas (Figura 5B). Aunque la escisión a 70 °C/24 h proporcionó el rendimiento más elevado como en los productos de escisión no específica (por ejemplo, el péptido con peso molecular de 3142 generado a partir de Pro-CNP38 por escisión entre el enlace peptídico Asp y Arg) aumentaba de forma radical (Figura 5C).

El rendimiento y la pureza de la producción de Pro-CNP38 aumentaron cuando los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 se purificaron o se trataron o se trataban con tampón B-PER II antes de la escisión con ácido fórmico. Dado que el tampón B-PER II contiene detergente de octiltioglucoído y es relativamente caro, otros detergentes o tampones usados normalmente se sometieron a ensayo para producción de Pro-CNP38 a gran escala. Los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 se volvieron a suspender en diferentes detergentes (Octilsacarosa; Triton x-100; Tween-20; NP-40; CA-630) o tampones (B-PER II; dilución a 1/20 de B-PER II; B-PER; tampón de fosfato de B-PER; Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9; Tris 25 mM, pH 7,5; agua filtrada; PBS) y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 24 horas. Todos los detergentes estaban en un 1 % en tampón Tris 25 mM, pH 7,4. Después de incubación en detergente o tampón, los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 se escindieron con un 2 % de ácido fórmico a 55 °C durante 22 horas. Los resultados mostraban que BPER II continuaba presentando un buen rendimiento, y también se obtuvieron resultados positivos con CA630 y Triton X-100.

Productos de escisión de la proteolítica de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")

Una proteasa sin identificar, posiblemente una proteasa asociada a membrana, escindió al péptido de Pro-CNP38 (producido a partir de la cepa BL21, PM 4102) en dos péptidos durante la purificación de Pro-CNP38, dando como resultado los péptidos PGQEHPNAR (PM 1004) (SEQ ID NO: 198) y KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQSMGLGC (PM 3115) (SEQ ID NO: 199). Sin quedar ligado por la teoría, una posible razón de por qué los detergentes pueden mejorar el rendimiento y la pureza de Pro-CNP38 es que los detergentes podrán retirar la mayor parte, pero posiblemente no toda, la proteasa sin identificar. El pH básico, a temperatura elevada y EDTA se sometieron a ensayo para identificar si estos agentes podían inhibir la escisión de proteasa. Los cuerpos de inclusión de TAF-Pro-CNP38 se incubaron a TA o 120 °C durante 2 hrs y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min. Los sedimentos se volvieron a suspender en un 2 % de ácido fórmico y se incubaron a 55 °C o 70 °C durante 18 horas. Una proporción de 1:1 de Tris 0,5 M se añadió para neutralizar la escisión. Las muestras neutralizadas centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes se dejaron a TA durante 6 hrs o 22 hrs con o sin EDTA 10 mM, pH 10. La escisión proteolítica se sometió a ensayo por LC/MS (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados por de LC/MS de la escisión proteolítica de Pro-CNP38

Muestra		Área máxima de A210	Conc. de Proteína (mg/ml)		Porcentaje de PM4102	Porcentaje de PM 3115
1	H 55C	942	0,04	*	91,8	8,2
2	H700	2878	0,11	*	79,2	20,7
3	H 70 6H	2675	0,10	*	80,6	19,4
4	H 70 24	2741	0,11	*	79,2	20,7
5	H 70 EDTA	2385	0,09	*	80,8	19,2
6	H 70 pH 10	1917	0,07	*	81,2	18,8
7	55C	1291	0,05		61,1	38,9
8	70C 0	4533	0,18		96,8	3,2
9	70C 6H	4120	0,16		97,5	2,5
10	70C 24	4108	0,16		96,5	3,5
11	70C EDTA	4336	0,17		96,9	3,1
12	70C pH 10	3425	0,13		97,5	2,4

Todas las muestras (8-12) escindidas a 70 °C presentaban una escisión proteolítica limitada (menos de un 4 % de escisión de Pro-CNP38). Casi un 40 % de Pro-CNP38 se escindió por proteasa cuando la escisión se realizaba a 55 °C (muestra 7). El pH básico pH y EDTA no influían en la escisión proteolítica no específica. La temperatura elevada (120 °C durante 2 hrs) escindía a Pro-CNP38 de forma no específica.

Se debería indicar que la cepa BL21(DE3) de Stratagene no tiene la proteasa sin identificar.

Producción de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") y otras variantes de CNP a partir de diferentes construcciones

Pro-CNP38 se puede producir a gran escala en *E. coli* por medio de sobreexpresión de una proteína de fusión de TAF-Pro-CNP38 en forma de cuerpos de inclusión seguido de escisión con ácido fórmico de la proteína de fusión. Siguiendo los métodos que se describen en el presente documento, otras proteínas de fusión de TAF-CNP (TAF-CNP34 y TAF-Pro-CNP53) se expresaban como cuerpos de inclusión y a continuación se escindieron con ácido fórmico para generar las variantes de CNP, CNP34 y Pro-CNP53. La Figura 6 representa la expresión de TAF-CNP34. La Figura 7, la expresión de TAF-Pro-CNP53. La Figura 8, los productos de la escisión con ácido fórmico de TAF-CNP34 y TAF-Pro-CNP53. La Figura 9, el pico para CNP-34 en un cromatograma de LC/MS, y la Figura 10, el pico para Pro-CNP53 en un cromatograma de LC/MS.

El uso de ácido fórmico puede dar como resultado la escisión(s) no específica de un enlace(s) peptídico distinto del enlace Asp-Pro a que se dirige. Para aumentar la pureza y la titulación global del producto de escisión de ácido fórmico deseado, diferentes restos de ácido aspártico en TAF12 o fragmentos del mismo se cambiaron por ácido glutámico. Además, uno o más restos de cisteína en TAF12 o fragmentos del mismo se cambiaron por alanina para prevenir la formación de enlace y disulfuro no específico. Todas las proteínas de fusión de TAF-Pro-CNP38 que tienen tales mutaciones en TAF12 se expresaban como cuerpos de inclusión y se escindieron con ácido fórmico para producir Pro-CNP38. La Figura 7 muestra la expresión de TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38 y TAF(C/A y

10D/10E)-Pro-CNP38. La Figura 11, la expresión de TAF(C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38 y TAF(4D/4E)-Pro-CNP38. La Figura 12, los productos de escisión con ácido fórmico de TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 y TAF(C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38, y la Figura 13, los productos de escisión con ácido fórmico de TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38 y TAF(C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38. La Tabla 9 resume la pureza (antes de purificación) y la titulación de Pro-CNP38 obtenido a partir de las diversas construcciones de TAF-Pro-CNP38.

Tabla 9

Construcción	Pureza	Titulación (ug/ml)
pJexpress-TAF-Pro-CNP38	32 %	44
pJexpress-TAF(C/A)-Pro-CNP38	41 %	50
pJexpress-TAF(4D/4E)-Pro-CNP38	36 %	52
pJexpress-TAF(C/A y 4D/4E)-Pro-CNP38	42 %	58
pJexpress-TAF(C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38*	32 %	26
pJexpress-TAF-NL-(C/A y 6D/6E)-Pro-CNP38	50 %	55

* Las células con pJexpress-TAF(C/A y 10D/10E)-Pro-CNP38 crecían más lentamente y la densidad celular final (DO₆₀₀) era menor en comparación con otras construcciones de TAF-Pro-CNP38.

Producción a gran escala de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") por fermentación y escisión con ácido fórmico

Las células BL21(DE3) que comprenden la construcción pJexpress-TAF-CNP se cultivaron en fermentador de 10 litros a 37 °C durante aproximadamente 16-17 horas hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 64. A continuación, las células crecieron/se cultivaron en presencia de IPTG 1 mM a aproximadamente 35-37 °C, para inducir la expresión de la proteína de fusión de TAF-Pro-CNP38, durante aproximadamente 7-8 horas hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 160. La fermentación produjo una titulación de 9 g/l de TAF-Pro-CNP38. La Figura 14 presenta una transferencia de Western de la proteína de fusión de TAF-Pro-CNP38 producida en la fermentación.

Un sedimento celular recuperado a partir de cultivo celular de 750 ml a partir de la fermentación de 10 l se volvió a suspender en solución salina con fosfato, pH 7,4 (PBS) y se lisó mediante tres pasajes a través de un homogeneizador a presión (1.000 MPa). El lisado resultante se centrifugó a 6.500 g durante 10 minutos y el sobrenadante se desechó. La fracción de sedimento que contenía los cuerpos de inclusión de proteína de fusión de TAF-Pro-CNP38 insoluble se volvió a suspender en 500 ml de PBS con un rotoestator. La suspensión se centrifugó a 6.500 g durante 10 minutos y el sobrenadante se desechó. El sedimento de cuerpo de inclusión resultante se volvió a suspender en 500 ml de agua con un rotoestator y se incubó a 55 °C durante 30 minutos. Se añadieron 250 ml de un 6 % de ácido fórmico a la suspensión de cuerpo de inclusión caliente para una concentración final de un 2 % de ácido fórmico y se incubó a 55 °C durante 20-24 horas. Se añadieron 50 ml de Na₂HPO₄ 400 mM después de 20-24 horas para comenzar la neutralización de la reacción de escisión con ácido fórmico, y la mezcla resultante se valoró con NaOH al 50 % en p/v a pH 6,9-7,4 y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la neutralización, se forma un precipitado pesado y se retiró por centrifugación a 6.500 g durante 10 minutos. El sobrenadante se retuvo y contenía un promedio de 1,3 g/l de cultivo de Pro-CNP38 puro al 80 %. La mayor parte de *E.coli* y proteínas y péptidos relacionados con TAF permanecían en el sedimento

El Pro-CNP38 soluble que resulta de la escisión con ácido fórmico y el sobrenadante neutralizado era puro en un 80 % y contenía una mezcla de péptidos de Pro-CNP38 lineales y ciclados junto con otras impurezas relacionadas con el producto. El sobrenadante de pH neutro que contenía Pro-CNP38 se filtró de manera estéril. La purificación adicional mediante cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Fractogel TMAE Hi-CAP (EMD Biosciences) para retirar ADN, endotoxinas, y contaminantes peptídicos, que se pudieran unir a la columna, se realizó a pH 7-7,4. La fracción de flujo continuo contenía el Pro-CNP38 parcialmente ciclado. Se añadió sulfato cúprico a la fracción de flujo continuo hasta una concentración final de 10 uM y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La adición de Cu⁺⁺ a pH neutro catalizaba la oxidación de los grupos sulfhidrilo sin cisteína en el péptido para formar un enlace disulfuro intramolecular, dando como resultado un 100 % de Pro-CNP38 ciclado y ningún péptido lineal detectable. La conductividad de la solución se ajustó a < 15 mS/cm mediante la adición de agua. A continuación, se realizó la cromatografía de intercambio catiónico usando una columna de SP-Sepharose (GE Healthcare) y un tampón de fosfato sódico (pH 7) para retirar cualquier ADN y endotoxinas restantes en el flujo continuo y adicionalmente se purificó Pro-CNP38 a aproximadamente una pureza de un 95-96 % con < 0,5 % de impurezas no relacionadas con el producto. La Figura 15 es un SDS-PAGE de fracciones de eluato a partir de la columna de SP-Sepharose; las concentraciones más elevadas de Pro-CNP38 se encontraron las fracciones 22 a 30. El análisis de HPLC/MS en fase inversa de la fracción 24 no combinada indicaba la presencia de un 90 % de Pro-CNP38, un 5 % de Pro-CNP38 con un resto de metionina oxidada, un 3 % de Pro-CNP38 escindido en el enlace Gly-Cys para formar CNP-17, y un 1,6 % de Pro-CNP38 escindido en el enlace Asp-Arg en el dominio cíclico. El rendimiento del péptido Pro-CNP38 curó después de purificación final era de 0,9 g/l de cultivo celular (recuperación total de un 36 %).

El Pro-CNP38 recogido de cinco purificaciones separadas se combinó para su formulación. El producto combinado contenía un 93,5 % de Pro-CNP38, un 3,3 % de Pro-CNP38 con un resto de metionina oxidada, un 1,3 % de Pro-CNP38 desamidado, y un 1 % de Pro-CNP38 escindido en el enlace Gly-Cys para formar CNP-17. Las muestras se diluyeron con fosfato sódico 50 mM (pH 7) hasta una conductividad de 10 mS/cm y se cargó sobre una columna de CM-Sepharose (GE-Healthcare) para su concentración e intercambio de tampón. La propiedad de intercambio catiónico débil de la resina de CM-Sepharose permite que los péptido se disocien a partir de la columna con soluciones de ácido débil en lugar de con los gradientes de sal habituales. Las concentraciones de ácido requeridas para la disociación de Pro-CNP38 a partir de la columna de CM-Sepharose dependían de la carga de la columna. A 50 mg de Pro-CNP38 por ml de resina, para la elución de Pro-CNP38 era suficiente con HCl 10 mM. A 9 mg de Pro-CNP38 por ml de resina, para la elución se requería HCl 50 mM. Cuando la carga era de 9 mg de Pro-CNP38 por ml de resina, el Pro-CNP38 eluía en menos de un volumen de columna, que concentraba de forma significativa al péptido. La fracción de eluato contenía 20,3 mg/ml de Pro-CNP38 puro al 95 %, junto con Pro-CNP38 al 3 % con un resto de metionina oxidada, Pro-CNP38 desamidado al 1 %, y < 1 % de Pro-CNP38 escindido en el enlace Gly-Cys para formar CNP-17. La solución concentrada de Pro-CNP38 en ácido débil es adecuada para su dilución en tampones apropiados para cualquier formulación líquida o liofilizada.

Ejemplo 3

Escisión de variantes de CNP con endopeptidasa neutra *in vitro*

Para determinar los efectos de sustituciones de aminoácido, prolongaciones de aminoácido, modificaciones de estructura principal, modificaciones de cadena lateral y PEGilación en la susceptibilidad de las variantes de CNP con respecto a la escisión con endopeptidasa neutra (NEP), se realizaron ensayos de escisión peptídica usando un ensayo *in vitro* que controlaba la desaparición de la variante de CNP no escindida.

Se añadió NEP recombinante humana (1 ug/ml de concentración final) se añadió a la variante de CNP 100 uM diluida en Tris 0,1 M, pH 7, La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante diversos periodos de tiempo, y la reacción se interrumpió con EDTA (10 mM final) seguido de desnaturalización con calor. La mezcla de reacción se redujo y a continuación los productos de la reacción se analizaron usando HPLC y espectroscopía de masas. La semivida de la variante de CNP se calculó basándose en la desaparición de la variante de CNP intacta con el tiempo. Los resultados de las variantes de CNP digeridas se compararon con una digestión paralela de wtCNP22 y se normalizaron con respecto a los resultados para CNP22 100 uM digerida con 1 mg/ml de NEP ($t_{1/2} = 80$ min).

La Tabla 1 enumera las semividas, basándose en el ensayo de escisión con NEP *in vitro*, de diversas variantes de CNP que tienen unas modificaciones de estructura principal o de cadena lateral. Sin embargo, la retirada de tres de los seis sitios de escisión con NEP en el Análogo L dio lugar a una semivida sustancialmente más corta. De las variantes de CNP sometidas a ensayo, la mayor resistencia a la escisión con NEP fue presentada por el Análogo N, que contiene el enantiómero D de los 22 aminoácidos de CNP22, y por el Análogo M, que tiene un enlace amida N-metilado tanto en Leu9 en Leu11. Sin embargo, los Análogos tanto N como M fallaban en la estimulación de la producción de cGMP (véase a continuación).

Comparando las semividas de los Análogos A, B, E, F, G y H entre sí, se determinó que las semividas eran de aproximadamente 1,5 aproximadamente 2,5 veces más largas para los Análogos E y G en comparación con las de los Análogos A, B, F y H. Todos estos seis análogos mostraban resistencia o a aumento de la resistencia a la escisión en el enlace Cys6-Phe7 con respecto a wtCNP22 (los datos no se muestran). El orden de clasificación de la resistencia del análogo a NEP a 1 ug/ml, basándose en la semivida, es Análogo G (3-Cl-Phe) \geq Análogo E (D-Phe) > Análogo H ("beta-2 Phe"), Análogo B (N-Me-Phe), y Análogo F (t-Bu-Gly) = wtCNP22 > Análogo A (Cys-CH₂-NH). Los análogos E y G tienen una semivida aproximadamente 1,5 superior en comparación con wtCNP22. Además de la resistencia a la escisión del enlace Cys6-Phe7, los análogos B, E, F, G y H también mostraban resistencia a la escisión del enlace Gly8-Leu9 en presencia de 1 ug/ml de NEP (los datos no se muestran). Estos resultados indican que las variantes de CNP que tienen modificaciones de estructura principal o de cadena lateral entre Cys6 y Gly8 pueden ser resistentes a la escisión con NEP del enlace Cys6-Phe7 y/o Gly8-Leu9, pero no necesariamente tienen un aumento de la resistencia total con respecto a NEP o una semivida más larga que CNP22. Parece que los resultados son contrarios a los de los informes en la bibliografía en los que la NEP se escinde primero en el enlace Cys6-Phe7 del CNP22 y a continuación en cualquier otra parte.

Tabla 1

Análogo	Modificaciones de Estructura Principal y Cadena Lateral	Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
	Péptido Natriurético	10 nM	1 uM	($t_{1/2}$, min)
	CNP22 (SEQ ID NO: 1)	46 \pm 10	100 \pm 13	80 ²
N	D-CNP22 (todos los D-aminoácidos) (SEQ ID NO: 115)	2	1	>> 160
A	CNP22, C6-CH ₂ -NH (carbonilo reducido) (SEQ ID NO: 56)	6	66	55

Análogo	Modificaciones de Estructura Principal y Cadena Lateral	Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP (t _{1/2} , min)
		10 nM	1 uM	
	Péptido Natriurético			
B	CNP22, N-metil-F7 (amida metilada) (SEQ ID NO: 57)	2	38	80
BD	CNP22, N-metil-L9 (SEQ ID NO: 116)	2	8	ND
BN	CNP22, N-metil-L11 (SEQ ID NO: 117)	10	51	ND
BE	CNP22, N-metil-L20 (SEQ ID NO: 118)	2	5	ND
M	CNP22, N-metil-L9, N-metil-L11 (SEQ ID NO: 94)	1	11	>> 160
K	CNP22, N-metil-L9, N-metil-L20 (SEQ ID NO: 92)	1	1	80
L	CNP22, N-metil-L9, N-metil-L11, N-metil-L20 (SEQ ID NO: 93)	18	10	30
J	CNP22, C6-CH ₂ -NH, N-metil-L9, N-metil-L20 (SEQ ID NO: 91)	ND	ND	50
E	CNP22, D-F7 (D-Phe) (SEQ ID NO: 136)	2	6	130
H	CNP22, Beta-2-F7 (3-amino-2-fenilpropionilo) (SEQ ID NO: 57)	2	2	80
G	CNP22, 3-cloro-F7 (SEQ ID NO: 137)	17	93	135
F	CNP22, t-butil-G8 (SEQ ID NO: 58)	2	18	80
V	CNP22, K4G, 3,4-dicloro-F7 (SEQ ID NO: 119)	ND	ND	68
X	CNP22, K4G, 3-metil-F7 (SEQ ID NO: 120)	ND	ND	68
	ANP	10	23	ND

¹ Estimulación de la producción de cGMP en células NIH3T3 con péptido natriurético con respecto a la producción de cGMP en presencia de CNP22 1 uM

² t_{1/2} promedio de la resistencia a NEP de CNP22 de 80 min. Debido a variaciones en la actividad catalítica de NEP entre experimentos, todas las digestiones de t_{1/2} de CNP22 se normalizaron con respecto a 80 min y el coeficiente de diferencia se usó para calcular el t_{1/2} del análogo en cada experimento para obtener un t_{1/2} ajustado.

ND = No Determinado

La Tabla 2 enumera las semividas, basándose en el ensayo de escisión con NEP *in vitro*, de diversas variantes de CNP que tienen sustituciones con aminoácidos naturales y/o no naturales. De las variantes sometidas a ensayo, la mayor resistencia a la escisión con NEP fue presentada por el Análogo BK, que tiene sustituciones de K4R y G15S, y el Análogo BJ, que tiene sustituciones de K4R y G15N.

5

Tabla 2

Análogo	Mutaciones Específicas	Respuesta relativa de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP (t _{1/2} , min)
		10 nM	1 uM	
	Péptido Natriurético			
	CNP22 (SEQ ID NO: 1)	46 ± 10	100 ± 13	80
AH	CNP22, K4R (SEQ ID NO: 35)	59	121	80
BP	CNP22, K4R, G5S (SEQ ID NO: 121)	45	ND	ND
BO	CNP22, K4R, G5R (SEQ ID NO: 122)	18	80	ND
P	CNP22, K4G (SEQ ID NO: 123)	ND	ND	68
Z	CNP22, K4R, F7Y (SEQ ID NO: 95)	2	18	ND
AB	CNP22, K4R, G8S (SEQ ID NO: 97)	26 ± 26	86 ± 17	ND
AA	CNP22, K4R, G8V (SEQ ID NO: 96)	3	25	ND
AC	CNP22, K4R, G8T (SEQ ID NO: 98)	11 ± 2	66 ± 16	80
AD	CNP22, K4R, L9T (SEQ ID NO: 99)	4	68	ND
BH	CNP22, K4R, K10R (SEQ ID NO: 112)	12	80	ND

Análogo	Mutaciones Específicas	Respuesta relativa de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
		10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
	Péptido Natriurético	10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
BF	CNP22, K4R, K10Cit (SEQ ID NO: 110)	6	33	ND
BG	CNP22, K4R, K100 (SEQ ID NO: 111)	9	45	ND
BY	CNP22, K4R, K10S (SEQ ID NO: 124)	16	53	ND
BK	CNP22, K4R, G15S (SEQ ID NO: 114)	13 ± 1	71 ± 11	≥ 160
BJ	CNP22, K4R, G15N (SEQ ID NO: 113)	4	41	150
AE	CNP22, K4R, G15R (SEQ ID NO: 100)	0,3	0,3	ND
AF	CNP22, K4R, G15Cit (SEQ ID NO: 101)	1,4	2	ND
BZ	CNP22, K4R, S16Q (SEQ ID NO: 125)	42	116	ND
BX	CNP22, K4R, M17N (SEQ ID NO: 126)	40 ± 2	103 ± 17	ND
AG	CNP22, K4R, M17V (SEQ ID NO: 102)	10	65	ND
BQ	CNP22, K4R, G19S (SEQ ID NO: 127)	21	63	ND
BR	CNP22, K4R, G19R (SEQ ID NO: 128)	22 ± 6	84 ± 10	ND
AJ	CNP22, K4R, L20V (SEQ ID NO: 103)	0,2	8	ND
AK	CNP22, K4R, L20t-butyl-Ala (SEQ ID NO: 104)	1	21	ND
AT	CNP22, G1 E, K4E (SEQ ID NO: 105)	11	54	60
BS	CNP22, K4R, L20R (SEQ ID NO: 129)	11	8	ND
BT	CNP22, K4R, G21S (SEQ ID NO: 130)	7	39	ND
BU	CNP22, K4R, G21T (SEQ ID NO: 131)	6	21	ND
BW	CNP22, K4R, G21 R (SEQ ID NO: 132)	20	21	ND
	ANP	10	23	ND

1 Estimulación de la producción de cGMP en células NIH3T3 con péptido natriurético con respecto a la producción de cGMP en presencia de CNP22 1 uM
 2 t_{1/2} promedio de la resistencia a NEP de CNP22 de 80 min. Debido a variaciones en la actividad catalítica de NEP entre experimentos, todas las digestiones de t_{1/2} de CNP22 se normalizaron con respecto a 80 min y el coeficiente de diferencia se usó para calcular el t_{1/2} del análogo en cada experimento para obtener para obtener un t_{1/2} ajustado.
 ND = No Determinado

La Tabla 3 enumera las semividas, basándose en el ensayo de escisión con NEP *in vitro*, de variantes de CNP que tienen modificaciones N-terminales y/o C-terminales, incluyendo prolongaciones de aminoácido. De los análogos sometidos a ensayo, los Análogos AZ, CC, CF, BL, CS, CK y CL, Pro-Gly-CNP37 y HSA-CNP27 eran los más resistentes a la degradación con NEP.

5

Tabla 3

	Modificaciones N- y C-Terminales	Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
		10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
	Péptido Natriurético	10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
	CNP22	46 ± 10	100 ± 13	80
BC	Ácido pentanoico (N-term.)-CNP22, G1 E (SEQ ID NO: 109)	ND	ND	ND
BB	Ácido heptanoico (N-term.)-CNP22, G1 E (SEQ ID NO: 108)	32 ± 4	84 ± 19	45-65
AV	Ácido pentanoico (N-term.)-CNP22, G1 E, K4E (SEQ ID NO: 106)	ND	ND	120
AW	Ácido heptanoico (N-term.)-CNP22, G1 E, K4E (SEQ ID NO: 107)	ND	ND	< 20
AX	CNP17 (delta N-term) (SEQ ID NO: 2)	18	69	ND

ES 2 608 457 T3

	Modificaciones N- y C-Terminales	Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
		10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
	Péptido Natriurético			
	R-CNP22 (SEQ ID NO: 40)	ND	ND	ND
AZ	R-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 41)	54 ± 11	106 ± 15	≥ 160
	ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38)	ND	ND	ND
BA	ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	38 ± 10	113 ± 10	90
	GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 65)	ND	ND	ND
AY	GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	59 ± 9	105 ± 20	65
	GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64)	ND	ND	ND
CH	GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	44 ± 8	95 ± 11	ND
	GANPR-CNP22 (SEQ ID NO: 66)	ND	ND	ND
CI	GANPR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 37)	50 ± 1	105 ± 12	ND
	GANSS-CNP22 (SEQ ID NO: 67)	ND	ND	ND
CG	GANSS-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 70)	27 ± 1	88 ± 1	95
CA	AAWARLLQEHPNA-CNP22 (SEQ ID NO: 61)	24	76	ND
CB	AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (SEQ ID NO: 62)	36	84	ND
CC	DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (SEQ ID NO: 63)	34	101	> 160
CF	GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (fragmento de IgG1 (Fc)) (SEQ ID NO: 79)	23 ± 9	72 ± 19	> 160
	PNARKYKGANKK-CNP22 (CNP34)	ND	ND	ND
BL	QEHPNARKYKGANKK-CNP22 (CNP37) (SEQ ID NO: 60)	43 ± 15	97 ± 27	>> 160
	PQEHPNARKYKGANKK-CNP22 (Pro-CNP37)	ND	ND	ND
CE	GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (fragmento de HSA) (SEQ ID NO: 81)	15	87	ND
CY	GQHKDDNPNLPRGANPR-CNP22 (fragmento de HSA) (SEQ ID NO: 80)	ND	ND	ND
CQ	GHHSHEQHPHGANQQ-CNP22 (fragmento de HRGP) (SEQ ID NO: 76)	16	95	ND
CX	GHHSHEQHPHGANPR-CNP22 (fragmento de HRGP) (SEQ ID NO: 78)	ND	ND	ND
CS	GQEHPNARKYKGANPK-CNP22 (CNP37 modificado) (SEQ ID NO: 129)	19	61	>> 160
CT	GQEHPNARKYKGANQK-CNP22 (CNP37 modificado) (SEQ ID NO: 130)	60	121	ND
CU	GQEHPNARKYKGANQQ-CNP22 (CNP37 modificado) (SEQ ID NO: 131)	9	57	ND
DB	GQEHPNARKYKGANKK-CNP22 (Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 75)	50 ± 14	98 ± 17	>> 160
	PGQEHPNARKYKGANKK-CNP22 (Pro-Gly-CNP37)	49 ± 6	103 ± 17	>> 160
CW	GQEHPNARKYKGANKP-CNP22 (CNP37 modificado) (SEQ ID NO: 74)	ND	ND	ND
CR	GAHHPHEHDTHGANQQ-CNP22 (fragmento de HRGP) (SEQ ID NO: 128)	14 ± 5	77 ± 12	ND
CZ	FGIPMDRIGRNPR-CNP22 ("inhibidor de NPR C" de osteocrina) (SEQ ID NO: 82)	ND	ND	ND

	Modificaciones N- y C-Terminales	Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
		10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
	Péptido Natriurético			
DA	GKRTGQYKLGSKTGPGRP-CNP22 (fragmento de "dominio de unión a heparina" de FGF2 (SEQ ID NO: 83))	ND	ND	ND
CK	GQPREPQVYTGANQQ-CNP22, K4R (fragmento de IgG1 (Fc)) (SEQ ID NO: 84)	2	32	≥ 160
CL	GVPQVSTSTGANQQ-CNP22, K4R (fragmento de HSA) (SEQ ID NO: 85)	3	35	> 160
	GHKSEVAHRFKGANKK-CNP22 (HSA-CNP27) (SEQ ID NO: 144)	51 ± 9	109 ± 15	>> 160
	PGHKSEVAHRFKGANKK-CNP22 (Pro-HSA-CNP27)	32	107	ND
CN	GQTHSSGTQSGANQQ-CNP22, K4R (fibrinógeno) (SEQ ID NO: 87)	12	115	ND
CM	GQPSSSSQSTGANQQ-CNP22, K4R (fibronectina) (SEQ ID NO: 86)	ND	ND	ND
CO	GSTGQWHSESGANQQ-CNP22, K4R (fibrinógeno) (SEQ ID NO: 88)	2	33	ND
CP	GSSSSSSSSSGANQQ-CNP22, K4R (dedo de cinc) (SEQ ID NO: 89)	ND	ND	ND
CD	SPKMVQGGSG-CNP17-KVLRRH ("colas de BNP") (SEQ ID NO: 68)	25	102	ND
CJ	RSSCFGGRIDRIGAC ("C-ANP4-23", derivado de ANP) (SEQ ID NO: 133)	ND	ND	ND
	CNP22, K4R, K10R, N-term.--dímero N-term. / glutarato de disuccinimidilo (SEQ ID NO: 134)	19	44	ND
	CNP22, K4R, K10R, N-term.-- dímero N-term. / Bis-PEO5 (SEQ ID NO: 135)	19	41	ND
BM	CNP53 (SEQ ID NO: 4)	61	101	>> 160
	ANP	10	23	ND

¹ Estimulación de la producción de cGMP en células NIH3T3 con péptido natriurético con respecto a la producción de cGMP en presencia de CNP22 1 uM

² t_{1/2} promedio de la resistencia a NEP de CNP22 de 80 min. Debido a variaciones en la actividad catalítica de NEP entre experimentos, todas las digestiones de t_{1/2} de CNP22 se normalizaron con respecto a 80 min y el coeficiente de diferencia se usó para calcular el t_{1/2} del análogo en cada experimento para obtener para obtener un t_{1/2} ajustado.

ND = No Determinado

La Tabla 4 enumera las semividas, basándose en el ensayo de escisión con NEP *in vitro*, de variantes de CNP conjugadas con polímeros de PEG (o PEO) en el extremo N-terminal. Todas las variantes de CNP PEGilado sometidas a ensayo como se muestra en la Tabla 4 mostraban resistencia o aumento de la resistencia a la escisión con NEP excepto PEO12-GANPR-CNP22(K4R), que tenía la misma semivida que wtCNP22. No parece que la PEGilación N-terminal de CNP22 que tiene una sustitución de K4G confiera una mejora sustancial en la resistencia a NEP. Por ejemplo, PEG2K-CNP22(K4G) solo era ligeramente más resistente a la escisión con NEP que CNP22 (los datos no se muestran), mientras que PEG2K-CNP22 presentaba una semivida *in vitro* mucho más larga que CNP22.

Tabla 4

PEGilación N-terminal		Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
Péptido Natriurético	PEG	10 nM	1 uM	(t _{1/2} , min)
CNP22		46 ± 10	100 ± 13	80

PEGilación N-terminal		Respuesta rel. de cGMP a CNP22 ¹ 1 uM		Escisión con NEP
CNP22	PEG20K	0	15	>> 160
CNP22	PEG5K	8 ± 1	20 ± 7	>> 160
CNP22	PEG2K	6 ± 2	32 ± 4	>> 160
CNP22	PEO4-(PEO12) ₃ (ramificado)	17 ± 1	52 ± 6	>> 160
CNP22	PEO24 (1,2 kDa)	8 ± 5	46 ± 10	>> 160
CNP22	PEG1K	15 ± 3	68 ± 17	> 160
CNP22	PEO12 (0,6 kDa)	12 ± 7	57 ± 18	160
CNP22	(PEO12)-Biotina	19	81	140
CNP22, K4G	(PEO12)-Biotina	10	27	100
CNP22, K4R	PEO24	15	56	ND
CNP22, K4R	PEO12	13	44	ND
CNP-17	PEG2K	5	50	> 160
R-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 41)	PEO24	15 ± 2	75 ± 12	ND
R-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 41)	PEO12	23 ± 2	93 ± 19	≥ 160
ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	PEO24	6 ± 2	60 ± 10	ND
ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	PEO12	20 ± 1	92 ± 25	ND
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEG2K	15 ± 2	45 ± 18	ND
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEO24	28 ± 9	82 ± 18	>> 160
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEG1K	15 ± 0,4	56 ± 23	> 160
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEO12	40 ± 2	99 ± 13	> 160
GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	PEO24	16 ± 13	73 ± 30	ND
GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	PEO12	30	78	ND
GANPR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 37)	PEO24	ND	ND	ND
GANPR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 37)	PEO12	ND	ND	80
GANSS-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 70)	PEO24	8 ± 5	46 ± 21	ND
GANSS-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 70)	PEO12	8 ± 0,3	52 ± 13	ND

¹ Estimulación de la producción de cGMP en células NIH3T3 con péptido natriurético con respecto a la producción de cGMP en presencia de CNP22 1 uM

² t_{1/2} promedio de la resistencia a NEP de CNP22 de 80 min. Debido a variaciones en la actividad catalítica de NEP entre experimentos, todas las digestiones de t_{1/2} de CNP22 se normalizaron con respecto a 80 min y el coeficiente de diferencia se usó para calcular el t_{1/2} del análogo en cada experimento para obtener para obtener un t_{1/2} ajustado.

ND = No Determinado

5 La Figura 16 muestra el perfil de resistencia a NEP de cinco conjugados de CNP22 PEGilado N-terminal. Los péptidos de CNP22 conjugados con polímeros de PEG (o PEO) de masa creciente mostraban un aumento de la resistencia a la degradación con NEP. En particular, PEO24-CNP22, PEG2K-CNP22 y PEG5K-CNP22 eran resistentes a la degradación con NEP durante el periodo de ensayo de 160 minutos.

10 La Figura 17 presenta el perfil de resistencia a NEP de variantes CNP37 de CNP (Análogo BL), CNP53 y GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) que tienen una prolongación de aminoácido N-terminal. Como se puede observar claramente, tanto CNP37 como CNP53 eran resistentes a la degradación con NEP en este ensayo *in vitro*, mientras que GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) tenía la misma labilidad a la hidrólisis de NEP que CNP22.

La Figura 18 representa el perfil de resistencia a NEP de CNP17 y GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) conjugados con un resto de PEG (o PEO) en el extremo N-terminal. La PEGilación de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ

ID NO: 36) aumentaba en gran medida la resistencia a NEP de esta variante de CNP, con PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) siendo completamente resistentes a la escisión con NEP durante el periodo de ensayo de 160 minutos. El aumento de la masa del resto de PEO de aproximadamente 0,6 kDa (PEO12) a aproximadamente 1,2 kDa (PEO24) aumentaba la resistencia a NEP del GANRR-CNP22(K4R) PEGilado (SEQ ID NO: 36). La PEGilación de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) a un resto de PEO24 monodisperso en lugar de un resto de PEG1K polidisperso también aumentaba la resistencia a NEP. Por último, aunque tanto PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) como PEG2K-CNP17 tienen una masa total similar (teniendo en cuenta que PEG2K es polidisperso), el anterior presentaba una resistencia a NEP sustancialmente mejor.

También se realizaron ensayos de resistencia a NEP en wtCNP22 y variantes G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA", SEQ ID NO: 144) y PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36) de CNP. La Figura 19 muestra que G-CNP37 y CNP27-HSA eran completamente resistentes a la escisión con NEP, y CNP27-PEO12 presentaba una estabilidad a la degradación con NEP mucho más elevada en comparación con wtCNP22.

Ejemplo 4

Estimulación de la producción de cGMP en células NIH3T3 con variante de CNP

Para determinar la actividad funcional de las variantes de CNP, la producción de cGMP se midió en células NIH3T3 expuestas a las variantes de CNP. Las células NIH3T3 de murino expresan de forma endógena el receptor de la señalización de CNP, NPR-B, que comparte una identidad de secuencia de proteínas de un 98 % con el NPR-B humano. Las células NIH3T3 se cultivaron en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco de alta glucosa complementado con un 10 % de suero bovino fetal y antibióticos a 37 °C con un 5 % de CO₂. De veinticuatro a 48 horas antes de la señalización, las células se pasaron a placas de 12 pocillos con una densidad de 2-5 x 10⁵ células por pocillo en el momento del ensayo. Las variantes de CNP se volvieron a suspender en HCl 1 mM hasta una concentración de reserva de 1 mg/ml (455 uM para wtCNP22) y posteriormente se diluyeron a una solución de reserva de trabajo de 30 uM con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se prepararon diluciones en serie diez veces en solución salina tamponada con fosfato. El medio de cultivo se retiró de las células y se reemplazó con 0,4 ml de PBS/Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (50/50, v/v) que contenía isobutilmetilxantina 0,75 mM. Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 15 minutos antes de la adición de 0,2 ml de variante de CNP en PBS y la incubación continuó a 37 °C durante 15 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 0,2 ml de tampón de lisis proporcionado con el kit de ensayo de cGMP CatchPoint (Molecular Devices), y la producción de cGMP se determinó con el ensayo de cGMP de CatchPoint (Molecular Devices). Todos los experimentos de estimulación se realizaron por duplicado.

Las Tablas 1-4 resumen la capacidad de las variantes de CNP que tienen modificaciones de estructura principal o de cadena lateral, sustituciones de aminoácido, N-terminal prolongaciones de aminoácido, y/o N-terminal PEGilación, respectivamente, para estimular la producción de cGMP en células NIH3T3. En las cuatro tablas, los valores para la producción de cGMP en células NIH3T3 expuestas a una variante de CNP 10 nM o 1 uM se normalizan con respecto al número de células y producción de cGMP en presencia de wtCNP22 1 uM.

Con respecto a los resultados de la Tabla 1, solamente el Análogo G que tiene 3-CI-Phe en la posición 7 presentaba sustancialmente la misma actividad de estimulación de NPR-B a 1 uM que wtCNP22. Con respecto a la Tabla 2, diversas variantes de CNP con sustituciones de aminoácido, incluyendo los Análogos AH, BO, AB, BH, BZ, BX y BR, mostraban una actividad de estimulación de NPR-B sustancialmente similar a la de wtCNP22.

Teniendo en cuenta los resultados en la Tabla 3, muchas variantes de CNP que tienen modificaciones N-terminales y/o C-terminales, incluyendo prolongaciones de aminoácido, mostraban una actividad de estimulación de NPR-B comparable como wtCNP22. Las variantes funcionales de CNP incluyen el Análogo BB, que es CNP22(G1E) unido a ácido heptanoico en el extremo N-terminal, y el Análogo CD, que es el dominio cíclico de CNP22 ("CNP17" que retiene la secuencia de Cys6 a Cys22) conjugado con las "colas" N-terminales y C-terminales de BNP. La Figura 20 ilustra que GANRR-CNP22(K4R), CNP37 (SEQ ID NO: 36) (Análogo BL) y CNP53 todos mostraban una actividad de estimulación de NPR-B similar a la de wtCNP22 en el ensayo *in vitro*.

A partir de la nota de la Tabla 3 se observa que entre las variantes de CNP sometidas a ensayo tanto para funcionalidad de CNP como para resistencia a NEP, el Análogo AZ (R-CNP22(K4R)), Análogo CC, Análogo CF, Análogo BL (CNP37), Análogo DB (Gly-CNP37) y GHKSEVAHRFK-CNP27 (HSA-CNP27) (SEQ ID NO: 144) todos mostraban una actividad de estimulación de NPR-B sustancialmente similar a CNP22 mientras que eran sustancialmente más resistentes a la escisión con NEP que CNP22.

Con respecto a los resultados de la Tabla 4, nueve variantes N-terminales de CNP PEGilados a 1 uM estimulaban la producción de cGMP a al menos aproximadamente un 70 % del nivel conseguido por wtCNP22. Varios aspectos dignos de atención aparecen en la Tabla 4. En primer lugar, la PEGilación N-terminal de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) con un polímero de PEO monodisperso (PEO12 tiene aproximadamente 0,6 kDa, PEO24 aproximadamente 1,2 kDa) daba como resultado una funcionalidad de NPR-B mejor que con un polímero de PEG polidisperso (PEG1K tiene un peso molecular medio en número de polímero (M_n) de aproximadamente 1 kDa,

PEG2K aproximadamente 2 kDa) (véase también la Figura 21). En segundo lugar, la PEGilación N-terminal de wtCNP22 con un polímero de PEG polidisperso de M_n creciente (PEG1K, PEG2K, PEG5K y PEG20K) o con un polímero de PEO monodisperso de masa más elevada (PEO12 y PEO24) disminuiría de forma correspondiente la capacidad de activación de NPR-B de las variantes de CNP (véase también la Figura 22). En tercer lugar, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), que tiene la prolongación de GANRR N-terminal (SEQ ID NO: 8), estimulaba la producción de cGMP en mayor medida que PEO24-CNP22 y PEO24-CNP22(K4R). También se debe indicar que entre las variantes de CNP PEGilado N-terminales sometidas a ensayo tanto para la funcionalidad de CNP como para la resistencia a NEP, PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) todos tenían una actividad de estimulación de NPR-B sustancialmente similar a la de CNP22 aunque eran mucho más resistentes a la degradación con NEP que CNP22.

Entre las variantes de CNP enumeradas en las Tablas 1-4 y sometidas a ensayo tanto para la funcionalidad de CNP como para la resistencia a NEP, los Análogos G, BK, AZ, CC, CF, BL y DB, Pro-Gly-CNP37, HSA-CNP27 (GHKSEVAHRFK-CNP27) (SEQ ID NO: 144), PEG1K-CNP22, (PEO12)-biotina-CNP22, PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) todos tenían una actividad de estimulación de NPR-B sustancialmente similar a la de wtCNP22 mientras que eran sustancialmente más resistentes a la escisión con NEP que wtCNP22.

También se realizaron ensayos de producción de cGMP en las variantes G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA", SEQ ID NO: 144), wtCNP29 and PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36) de wtCNP22 y CNP. La Figura 23 muestra que CNP22 y todas las variantes de CNP sometidas a ensayo inducían la producción de niveles de cGMP similares a dosis de CNP baja o elevada.

Ejemplo 5

Especificidad de unión para NPR-A, NPR-B y NPR-C

Ensayo de Competición de Señalización

Para determinar la especificidad de unión de las variantes de CNP para el receptor NPR-C de eliminación, se realiza un ensayo de competición de señalización. Los plásmidos de expresión para NPR-B o NPR-C humano (cada uno adquirido en OriGene) se transfectan de forma transitoria y los receptores se expresan en células HEK293T. Cuarenta horas después de la transfección, las células NPR-B, NPR-C y HEK293T nativas se recogen, se hace recuento y se siembran en placas en una proporción de 1:1 (células NPR-B : células competidoras (ya sean células NPR-C o HEK293T nativas)) en placas de 12 o 96 pocillos. Veinte horas después de la siembra en placas, las células se procesan para el ensayo de estimulación de NPR-B/cGMP descrito en el Ejemplo 4. Si estuviera presente, se espera que el receptor natriurético de eliminación, NPR-C, se una e internalice a CNP, reduciendo de ese modo la concentración de CNP total disponible para señalización a través de NPR-B, dando como resultado una disminución de la producción de cGMP y un desplazamiento en la curva de dosis-respuesta hacia la derecha. Un desplazamiento hacia la derecha en la curva de dosis-respuesta se ha verificado para wtCNP22. No se espera que las variantes de CNP que tienen una reducción de la afinidad hacia NPR-C induzcan un desplazamiento, o se espera que induzcan un desplazamiento más pequeño, en la curva de dosis-respuesta hacia la derecha. Este ensayo de competición de señalización es similar al descrito previamente por Cunningham (documento de patente de Estados Unidos n.º 5.846.932, B. Cunningham, EMBO J. 13 (11): 2508 - 2515 (1994). Y, H. Jin *et al.*, J. Clin. Invest. 98 (4): 969-976 (1996)).

La actividad de estimulación con cGMP de wtCNP-22, Pro-Gly-wtCNP37 y ANP a través de NPR-B y NPR-A, y su selectividad para NPR-B con respecto a NPR-C y para NPR-A con respecto a NPR-C, se evaluaron en ensayos de competición de señalización. NPR-A, NPR-B y NPR-C individualmente se transfectaron de forma transitoria en células HEK293T. Treinta horas después de la transfección, las células se sembraron en placas de 96 pocillos: (A) 20.000 células NPR-B + 20.000 células transfectadas simuladas; (B) 20.000 células NPR-B + 20.000 células NPR-C; (C) 20.000 células NPR-A + 20.000 células transfectadas simuladas; y (D) 20.000 células NPR-A + 20.000 células NPR-C. Veinte horas después de la siembra en placa, los medios de cultivo se retiraron y sustituyeron con medios sin suero: PBS (1:1) + 0,75 uM de IBMX durante 15 minutos. Para la señalización de cGMP a través de NPR-B, se añadieron series de dosis para ANP, CNP-22 y Pro-Gly-CNP37 y se incubaron a 37 °C durante 12 minutos antes de que el ensayo se detuviera mediante lisis celular. Para la señalización de cGMP a través de NPR-A, se incubaron series de dosis para CNP-22 y Pro-Gly-CNP37 a 37 °C durante 12 minutos, mientras que las series de dosis para ANP se incubaron a 37 °C durante 6 minutos (porque parece que NPR-A es una guanilil ciclasa "más rápida" que NPR-B, el tiempo de incubación para ANP se acortó con el fin de no maximizar (usar todo el GTP celular) demasiado pronto cuando se señala con ANP). Las Figuras 24A y B muestran que CNP-22 y Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") estimulaban la producción de cGMP a través de NPR-B con curvas de dosis-respuesta similares y con un alcance mucho mayor que a través de NPR-A, y mostraban un perfil similar para la selectividad de NPR-B con respecto a la de NPR-C en los ensayos de competición de señalización.

Determinación de afinidades de unión (K_i) para NPR-A, NPR-B y NPR-C

Las afinidades de unión (K_i) de las variantes de CNP para NPR-A, NPR-B y NPR-C se determinan en un ensayo de unión de competición heteróloga (documento de patente de Estados Unidos n.º 5.846.932; B. Cunningham, EMBO J. 13 (11): 2508-2515 (1994); H. Jin *et al.*, J. Clin. Invest. 98 (4): 969-976 (1996)). Para ensayos de unión a ligandos radioetiquetados se preparan membranas de células HEK293, u otra línea celular transfectable de forma adecuada (por ejemplo, células HeLa) que expresan NPR-A, NPR-B o NPR-C humanos. Las preparaciones de membrana se diluyen en un tampón apropiado y se añaden concentraciones variables de variante de wtCNP22 o de CNP (competidor) con wtCNP22 etiquetado con 125 I (Bachem). Las muestras se incuban a temperatura ambiente para permitir el equilibrio de ligando/receptor y el péptido unido se separa del péptido libre por filtración a través de las membranas de filtro de PVDF. Los filtros se lavan antes de la adición de agente de centelleo y se hace recuento con un contador de centelleo. La unión se mide por duplicado para cada concentración de péptido competidor. La afinidad de la variante de CNP (K_i , constante de disociación de equilibrio) y $B_{máx}$ (índice de receptor) se calculan mediante análisis de regresión no lineal y/o la ecuación de Cheng-Prusoff.

Se espera que las variantes de CNP que presentan una reducción de la afinidad con respecto a NPR-C tengan una reducción de la susceptibilidad con respecto a la eliminación por NPR-C y, por lo tanto, una semivida más larga en plasma o en suero. El aumento de la semivida de las variantes de CNP en circulación podría aumentar la disponibilidad de las variantes para actividad terapéutica.

Ejemplo 6

Efecto de las variantes de CNP en el crecimiento de células de condrosarcoma de rata (RCS) y producción de cGMP en células RCS

Para evaluar la capacidad de las variantes de CNP para estimular el crecimiento óseo, se simula una displasia esquelética en cultivo celular mediante el tratamiento de células de condrosarcoma de rata (RCS) con factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), que activa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-3) e induce la detención del crecimiento (Krejci *et al.*, J. Cell Sci., 118 (21): 5089-5100 (2005)).

Los parámetros óptimos de tratamiento con CNP se determinan variando la concentración de CNP (0,05, 0,1, 0,2 y 0,5 μ M) y la duración y el intervalo de tratamiento (continuo, 2,5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 8 h una vez al día, 2,5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h y 4 h dos veces al día). Después de 72 horas, se hace el recuento de las células usando un contador de células automatizado, y la cantidad de matriz extracelular se calcula usando tinción con azul alcian.

A continuación, las células RCS se tratan con una variante de CNP usando las condiciones óptimas determinadas a partir de los experimentos de crecimiento con wtCNP22. La concentración de cGMP se mide por ELISA competitivo para células RCS no tratadas, células RCS tratadas con CNP y células RCS tratadas con la variante de CNP. También se controla el crecimiento celular y las síntesis de matriz que resultan del tratamiento con la variante de CNP y se comparan con las resultantes del tratamiento con CNP.

Para evaluar el efecto de las variantes de CNP en un sistema de cultivo de células humanas, los condrocitos humanos primarios nuevamente diferenciados en perlas alineadas se tratan con variantes de wtCNP22 y de CNP y la concentración de cGMP se determina mediante ELISA competitivo como una medición de la señalización de CNP eficaz.

Los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para evaluar la capacidad de las variantes de CNP para estimular la producción de cGMP y el crecimiento de células de condrosarcoma de rata *in vitro*.

Ejemplo 7

Estudio de Respuesta a la Dosis en Células de Condrosarcoma de Rata

El receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos del receptor de tirosina quinasa (FGFR-3), un regulador negativo del crecimiento de condrocitos, está de forma constitutiva en sujetos con acondroplasia. La estimulación del receptor FGFR-3 con FGF-2 provoca la detención del crecimiento mediante la activación prolongada de Erk MAPK, y provoca una disminución de la síntesis de la matriz y pérdida de la matriz, así como un cambio en la forma de la célula. La exposición continua de células de condrosarcoma de rata (RCS) al factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) simula la acondroplasia en cultivo celular mediante la activación de FGFR-3 y la inducción de la detención del crecimiento (Krejci *et al.*, J. Cell Sci., 118 (21): 5089-5100 (2005)). Para determinar la dosis de la variante de CNP y la frecuencia de la dosificación que estimulan un crecimiento suficiente de las células óseas, se realizó un estudio de respuesta a la dosis usando el ensayo de células RCS tal como se describe en el Ejemplo 6.

Las células RCS se sembraron a 10×10^3 células por pocillo en placas de 24 pocillos, se cultivaron durante 24 h, se trataron durante 72 h y a continuación se hizo el recuento. Las células RCS se expusieron continuamente a FGF-2

(5 ng/ml) para simular un FGFR-3 constitutivamente activa, que inducía la detención del crecimiento celular (véase la barra n.º 5 en la Figura 25). El CNP22 de tipo silvestre (0,2 uM) se cultivó de forma continua (72 h), 1 h al día o 2 h al día. Todos los estimulantes se cambiaban diariamente. La exposición continua de las células RCS a CNP22 0,2 uM en presencia de 4,0 ng/ml de FGF-2 invertía de forma parcial la detención del crecimiento inducido por FGF2, dando lugar al crecimiento de aproximadamente 200×10^3 células por pocillo (barra n.º 6 en la Figura 25), en comparación con aproximadamente 100×10^3 células por pocillo en ausencia de CNP22 (barra n.º 5 en la Figura 25).

Tanto la exposición de 1 h a CNP22 (0,2 uM) una vez al día como la exposición de 2 h a CNP22 (0,2 uM) una vez al día consiguió aproximadamente un 84 % del efecto de la exposición continua a CNP22 (0,2 uM) en el crecimiento de los condrocitos (barras n.º 7 y 8 en la Figura 25). Estos resultados demuestran que la exposición continua de los condrocitos de crecimiento parado con respecto a CNP22 no es necesaria para la inversión de la detención del crecimiento celular. Además, los estudios de respuesta a la dosis demuestran que las dosis más bajas de CNP22 son capaces de invertir la detención del crecimiento (Figura 26A).

Además, el análisis histológico y morfológico celular de la matriz extracelular mostraba que el tratamiento con CNP22 antagonizaba la pérdida de la matriz extracelular de condrosarcoma mediada por FGF2 y la síntesis de matriz aumentada. La exposición a FGF-2 disminuía la síntesis de la matriz y aumentaba la degradación, mientras que la adición de CNP22 al cultivo de células FGF-2 aumentaba la síntesis de la matriz e inhibía parcialmente a FGF-2, tal como se evalúa mediante la incorporación ^{35}S -sulfato y ^3H -Pro (Figuras 27 A-D). El análisis de la producción de agregano y fibronectina (ARNm y proteína) en células RCS cultivadas con FGF-2 y CNP22 muestra que FGF-2 disminuía el nivel de agregano y aumentaba el nivel de fibronectina, que se inhibía mediante la adición de CNP22 (Figuras 28 A-C). El FGF-2 induce y activa las moléculas de procesamiento de matriz predominantemente a través de Erk, y la adición de CNP22 muestra un cierto efecto sobre esta activación.

Los ensayos de alto rendimiento adicionales para la medición de la detención del crecimiento, tales como tinción con violeta cristal, son útiles para la medición de los efectos del CNP22 y sus variantes en células RCS.

Con las variantes de CNP que se describen en el presente documento se pueden realizar estudios de respuesta a las dosis similares para determinar su dosis eficaz para invertir la detención del crecimiento inducida por FGF2 de células RCS.

Ejemplo 8A

Estimulación *ex vivo* del crecimiento de tibia y fémur de ratones con acondroplasia leve

El modelo de cultivo de órganos de tibia de ratón se ha usado para demostrar la eficacia del CNP22 de tipo silvestre para estimular el crecimiento del hueso longitudinal. El tratamiento de tibias de tipo silvestre con CNP22 a 10^{-8} , 10^{-7} o 10^{-6} M durante 6 días aumentaba el crecimiento longitudinal en un 31 %, 40 % y un 42 %, respectivamente. La evaluación histológica también mostraba una expansión de la zona hipertrófica, por ejemplo, un aumento en el número y tamaño de condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento (Agoston *et al.*, BMC Dev. Biol. 7:18 (2007)). Se observaron hallazgos similares en tibias aisladas de ratones FGFR3^{Ach} (Yasoda *et al.*, Nat. Med. 10: 80-86 (2004)).

Para determinar la eficacia de las variantes de CNP en la estimulación del crecimiento de hueso longitudinal, las variantes de CNP se sometieron ensayo en un modelo de cultivo de órganos de ratón de crecimiento óseo endocondral en ratones de tipo silvestre y ratones transgénicos que tenían una mutación G380R en el gen FGFR-3 humano (heterocigoto para FGFR3^{wt/Ach}) que representan un modelo de ratón de acondroplasia leve. En resumen, la actividad farmacológica de variantes de CNP22 y CNP de tipo silvestre se comparó en un modelo de cultivo de órganos de tibias de ratón embrionario o neonatal, aisladas de los compañeros de camada de tipo silvestre y FGFR3^{wt/Ach}. Se evaluaron el crecimiento óseo total y los cambios histológicos dentro de la placa de crecimiento. El medio de cultivo acondicionado también se evalúa para biomarcadores de señalización intracelular (cGMP), metabolismo del cartílago (colágeno de tipo II, otros colágenos, sulfato de agregano y condroitina), metabolismo óseo (fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, colágeno de tipo I [C-telopéptido, N-telopéptido]), e inflamación (interleuquina 1, interleuquina 6, interleuquina 11).

Las variantes eficaces de CNP se identifican por su capacidad, por ejemplo, para estimular la producción de cGMP, y el crecimiento óseo tal como se mire por el aumento de la longitud ósea longitudinal y la expansión de las células en la zona hipertrófica de la placa de crecimiento.

Medición del crecimiento óseo

La eficacia de wtCNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) para estimular el crecimiento femoral longitudinal se evaluó en el modelo de cultivo de órganos de ratón. Para estos experimentos se aislaron fémures de ratones de tipo silvestre de 2-3 días de edad y se cultivaron en alfaMEM suplementado con un 0,2 % de BSA, L-glutamina 0,5 mM, 40 unidades de penicilina/ml y 40 ug de estreptomina/ml durante 8 días en presencia de vehículo, CNP22 o variantes de CNP. El tratamiento comenzó el día 0 y se repitió cada dos días a partir de ese

momento, a medida que se cambiaba el medio. Los huesos se midieron antes del tratamiento y cada dos días a partir de ese momento, usando un microscopio de disección equipado con un retículo de pieza ocular de 1 cm. Medio acondicionado se usó para análisis de biomarcadores. En el día 8, los huesos se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 h, se descalcificaron en un 5 % de ácido fórmico durante 24 horas, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Los huesos se seccionaron a 5 μm (micrómetros), los cuales a continuación se desparafinizaron, se volvieron a hidratar y se tiñeron con Azul Alcían durante 30 min (pH 2,5; MasterTech). El Azul Alcían tiñe el cartilago de color azul. Las secciones teñidas se visualizaron y se fotografiaron mediante microscopía de campo claro. El espesor de la región hipertrófica del cartilago de la placa de crecimiento se determinó por análisis de imagen.

La Figura 29 ilustra el efecto de wtCNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en el crecimiento longitudinal de fémures de ratón de tipo silvestre de 3 días de edad tratados con los péptidos de CNP cada dos días. Los resultados se normalizaron con respecto a las mediciones antes del tratamiento (día 0). Los estudios se realizaron por triplicado (vehículo) o por cuadruplicado (péptidos de CNP). Como se muestra en la Figura 29, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), así como CNP22, eran eficaces para estimular el crecimiento femoral longitudinal, con la variante de CNP PEGilado N-terminal siendo la más eficaz.

También se evaluó el crecimiento de fémur y tibia de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} respuesta a CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36). El cultivo de cualquiera de tibia de ratón de tipo silvestre o acondroplásica (FGFR3^{ac}) mostraba que tanto CNP37 como PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) aumentaban el crecimiento longitudinal de la tibia en comparación con el vehículo o CNP22 (Figuras 30 y 31). CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) también estimulaban el crecimiento del fémur de ratón de tipo silvestre (Figura 32). Además, cada uno de CNP22, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) y CNP37 aumentaban el crecimiento longitudinal de fémur de ratón de FGFR3^{ac} en comparación con el vehículo (Figura 33).

Además, se evaluó la distribución *ex vivo* de CNP37 en la placa de crecimiento de tibia de ratón de FGFR3^{ac}. Las muestras de hueso se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las secciones de parafina se cortaron y se fijaron con calor durante 1 hora a 60 °C. La recuperación del antígeno con hialuronidasa al 1 % a 37 °C (30 minutos) fue seguida con un bloqueo sérico de 1 hora (suero de cabra normal al 10 %). El anticuerpo CNP22 (dilución a 1:500, Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, California) se aplicó durante una noche a 4 °C. Para la inmunodetección, el kit Vectastain ELITE ABC (Vector, Burlingame, California) se usó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La peroxidasa unida específica se visualizó por incubación con el kit de sustrato DAB (Vector) y la reacción se desarrolló durante 3 minutos. A continuación, los portaobjetos se deshidrataron y se montaron se fotografiaron usando un microscopio de campo claro. La tinción para CNP en la placa de crecimiento de tibia de ratón de FGFR3^{ac} mostraba que la inmunoreactividad de CNP aumentada en las regiones de condrocitos articulares e hipertróficos (Figura 34), lo que indica que CNP37 se suministraba a los condrocitos.

Además de la distribución de las variantes de CNP en la placa de crecimiento óseo, también se evaluaron los efectos *ex vivo* de CNP37, CNP22 y vehículo sobre células en la placa de crecimiento de FGFR3^{ac} y de tipo silvestre, por ejemplo, tamaño celular hipertrófico y celularidad de la zona proliferante. Se prepararon muestras de hueso, incluyendo tinción con Azul Alcían, como se ha descrito anteriormente. Las imágenes de toda la placa de crecimiento proximal se tomaron a una magnitud 4x. La placa de crecimiento se divide en tres zonas, partiendo del lado epifisario del cartilago: la zona de reposo (condrocitos pequeños individuales), la zona de proliferación (columnas de condrocitos apilados paralelos al eje longitudinal del hueso) y la zona hipertrófica (condrocitos grandes y separaciones finas entre los condrocitos). En estas regiones, las mediciones se realizaron con el software ImageJ, incluyendo el número de condrocitos proliferantes por columna y la densidad de los condrocitos hipertróficos. Se usó un cuadrado de ensayo (4 x 4 mm²) en cinco regiones diferentes de la zona hipertrófica para determinar la densidad de los condrocitos hipertróficos. El tamaño celular de los condrocitos hipertróficos se calculó con 1 con respecto a la densidad celular determinada. La celularidad de las columnas proliferantes aumentó mediante CNP37 y CNP22 en ratones tanto de tipo silvestre como FGFR3^{ac} (Figuras 35B y C). La hipertrofia de condrocitos en ratones FGFR3^{ac} también aumentó como resultado del cultivo con CNP22 o CNP37 (Figuras 36B y C).

Los estudios *ex vivo* de cultivos de huesos de ratón indicaban que CNP37 se suministraba a la placa de crecimiento y era capaz de aumentar la celularidad y la hipertrofia de los condrocitos, que están asociados con la expansión de la placa de crecimiento y el crecimiento óseo longitudinal. Para evaluar la biodistribución de CNP37 en la placa de crecimiento óseo *in vivo* y los efectos *in vivo* de CNP37 en la placa de crecimiento (incluyendo el espesor de la placa de crecimiento total, el espesor de la zona hipertrófica y la celularidad de la zona proliferante), se obtuvieron muestras de hueso de ratones FGFR3^{ac} tratados con vehículo o CNP37 como se ha descrito anteriormente. Para biodistribución y estudios de efectos *in vivo*, las tibias se fijaron y se almacenaron en etanol al 70 %. Para la inmunohistoquímica, las muestras se descalcificaron en un 5 % de ácido fórmico 5 durante 2 días, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Los huesos se seccionaron a 5 μm (micrómetros), que a continuación se desparafinizaron, se rehidrataron y se usaron para la inmunohistoquímica de CNP como se ha descrito anteriormente. Para el análisis de imagen celular, los huesos se seccionaron a 5 μm (micrómetros), y a continuación desparafinizaron, se rehidrataron y se tiñeron durante 30 minutos (pH 2,5, MasterTech) y Hematoxilina y Eosina durante 30 segundos. Las secciones teñidas se visualizaron y fotografiaron mediante microscopía de campo claro.

Los espesores de la placa de crecimiento y las zonas proliferantes e hipertróficas se midieron usando el software ImageJ.

Los estudios de biodistribución *in vivo* demostraban que, del mismo modo que los estudios *ex vivo*, la inmunorreactividad de CNP aumentaba en las regiones de condrocitos articulares e hipertróficos en la placa de crecimiento de tibia de ratones FGFR3^{ac} tratados con CNP37, lo que indica que CNP37 se administraba *in vivo* a la placa de crecimiento de tibia del ratón FGFR3^{ac} (Figura 37). Además, el tratamiento con CNP37 aumentaba de forma significativa el espesor total de la placa de crecimiento, el espesor de la zona de proliferación y el espesor de la zona hipertrófica de tibia del ratón FGFR3^{ac} *in vivo* (Figuras 38A-C).

Estos resultados demuestran que las variantes de CNP de la divulgación penetran en la placa de crecimiento de animales de tipo silvestre y acondroplásico, aumentan el número y el tamaño de los condrocitos, aumentan el espesor de la zona de proliferación y la zona hipertrófica de la placa de crecimiento y aumentan el crecimiento óseo longitudinal en animales tratados de tipo silvestre y acondroplásicos. Por lo tanto, las variantes de CNP son útiles para estimular el crecimiento óseo en sujetos acondroplásicos.

Medición de biomarcadores

Además de la medición del crecimiento óseo como respuesta a las variantes de CNP, el ensayo de los niveles de biomarcadores para la formación de cartílago y hueso y el crecimiento inducido como respuesta a las variantes de CNP es útil para evaluar el efecto de las variantes de CNP en el crecimiento óseo.

Los fémures y las tibias se aislaron de ratones de tipo silvestre y FGFR3^{ac} como se ha descrito anteriormente. Los huesos se cultivaron con CNP22 o una variante del mismo durante ocho días con la sustitución del medio cada dos días. En el octavo día, el medio se recogió y se analizó para los biomarcadores de cGMP (guanosina cíclica en la posición 3', monofosfato cíclico en la posición 5') y fragmentos de colágeno de tipo II escindido, un marcador específico de cartílago para la renovación de cartílago. Ambos marcadores se midieron usando ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) disponibles en el mercado para cGMP (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, Michigan) y colágeno de tipo II escindido (Cartilaps) (Immunodiagnostic Systems, Fountain Hills, Arizona), siguiendo el protocolo del fabricante.

Los niveles de GMPc y fragmentos de colágeno de tipo II se midieron a partir de extractos de cultivo celulares después de exposición a CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36). Las Figuras 39-42 muestran un gran aumento ($p < 0,01$) en los niveles de cGMP en los medios después de la exposición de fémures y tibias de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} explantados a CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36). Además, la exposición de los fémures de ratón de tipo silvestre y FGFR3^{ac} a CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) aumentaba los niveles de colágeno de tipo II escindido, con los fémures de ratón FGFR3^{ac} tratados mostrando un aumento significativo ($p < 0,05$) de los fragmentos de colágeno de tipo II (Figura 43). Los niveles elevados de fragmentos de colágeno de tipo II indican una renovación de la matriz de cartílago, y la renovación del cartílago por lo general precede a la formación de hueso nuevo en el crecimiento de los huesos.

Ejemplo 8B

Estimulación *ex vivo* del crecimiento del fémur de ratones con acondroplasia severa

El efecto de una variante de CNP en el crecimiento de huesos de ratones con acondroplasia severa se evaluó *ex vivo*. En el estudio se usaron ratones transgénicos que expresan un gen FGFR-3 humano que tiene una mutación en Y367C (FGFR3^{Y367C}) [S. Pannier *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1792(2): 140-147 (2009)], que representan un modelo de ratón de acondroplasia severa. Los fémures se aislaron en el día embrionario 16,5 y se cultivaron durante 6 días en presencia de Pro-Gly-CNP37 1 μ M. Las longitudes de los huesos se midieron los que el Día 1 y el Día 7. A continuación, los huesos se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para evaluar los cambios histológicos y la morfología celular. El tratamiento de explantes de hueso aislado de ratones FGFR3^{Y367C} con Pro-Gly-CNP37 ("ProCNP38") dio como resultado un aumento en el crecimiento óseo y expansión en la placa de crecimiento (Figura 44). Los fémures de ratones FGFR3^{Y367C} tratados con vehículo durante 6 días mostraban una deficiencia de un 18 % el crecimiento longitudinal en comparación con los fémures de tipo silvestre tratados con vehículo. El tratamiento de fémures de los ratones FGFR3^{Y367C} con Pro-Gly-CNP37 1 μ M durante 6 días reducía la deficiencia del crecimiento hasta un 11 %, es decir, reducía el defecto de crecimiento en aproximadamente un 40 %.

Ejemplo 9

Estabilidad en Suero/Plasma de las Variantes de CNP *In Vitro*

En la preparación de los estudios de farmacocinética (PK), se evalúa la estabilidad de las variantes de CNP en suero y/o plasma.

En resumen, el analito se aísla mediante la eliminación de las proteínas séricas o plasmáticas mediante una precipitación en ácido tricloroacético al 2 % o una precipitación de suero:acetonitrilo a 1:3. La mezcla de precipitación se somete a agitación vorticial a 14.000 rpm durante cinco minutos y una porción del sobrenadante se retira y se diluye con agua antes de transferirse a un vial de muestreo automático silanizado para análisis. Los extractos de suero se analizan a continuación por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) con espectrometría de masas por ionización por electronebulización (ESI-MS). Para fines de cuantificación se controla una sola masa (m/z), que se muestra que es específica para la variante de CNP.

Inicialmente se determina la estabilidad analítica y la recuperación. Los parámetros analíticos (RP-HPLC y ESI-MS) se optimizan a través del análisis de los patrones de la matriz (extractos de suero fortalecidos con analito después de la precipitación). Después de la optimización, la recuperación analítica se determina con adiciones de muestras de suero a concentraciones conocidas y comparación de la respuesta del analito con la de los patrones de la matriz preparados a concentraciones similares. La estabilidad del analito en extractos de suero también se determina para asegurar que no se producen pérdidas significativas después de la precipitación en suero y antes del análisis real. Para somete a ensayo el efecto de congelación en la estabilidad del suero, también se realiza un estudio de congelación/descongelación de dos ciclos. En este estudio se realizan adiciones de una muestra de suero con variante de CNP y se analizan antes de la congelación durante una noche a -20 °C. A continuación, la muestra se descongela a temperatura ambiente y se vuelve a analizar. El proceso se repite para un segundo ciclo de congelación/descongelación.

La estabilidad en suero de la variante de CNP se determina mediante adiciones de muestras de suero/plasma con variante de CNP a una concentración de 10 µg/ml. La muestra se coloca en un baño de agua a 37 °C durante un periodo de tres horas. A intervalos de 30 minutos las alícuotas de suero por duplicado se retiran y se analizan. Si las pérdidas rápidas de analito son evidentes (> 50 % en 30 minutos), el estudio se puede repetir con momentos de 10 minutos.

En un método a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de las variantes de CNP en plasma murino, una mezcla de la variante de CNP (10 µl de una solución de reserva de aproximadamente 2,5-4,0 mg/ml), plasma murino heparinizado (50 µl, Bioreclamation, CD-1 Lith Hep 62231), y NaCl 5 M (10 µl) se incuba a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 0-5 h, y a coordinación se inactiva con 10x de cóctel inhibidor de proteasa (15 µl, Sigma P2714). Para la extracción, se añaden 150 µl de MeOH/FA al 0,1 % a 85 µl de la mezcla de reacción, y la mezcla resultante se somete a agitación vorticial durante 1 min y a continuación se centrifuga a 15 °C durante 15 min. 75 µl del sobrenadante se añaden a 300 µl de acuoso FA al 0,1 %. Una pequeña porción de la mezcla resultante se somete a análisis por LC/MS.

Ejemplo 10

Farmacocinética y Producción cGMP en Ratas y Ratones

Se realizaron estudios en ratas normales para evaluar el perfil farmacocinético (PK) de CNP22 y ciertas variantes de CNP y los cursos de tiempo de concentración de cGMP en plasma después de una sola administración intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.) de los péptidos de CNP. La inmunorreactividad de CNP en plasma se determinó usando un radioinmunoensayo competitivo (RIA) con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CNP. La concentración de cGMP en plasma se determinó mediante RIA usando un kit disponible en el mercado (kit de Ensayo de GMP cíclico de YAMASA, YAMASA Corporation).

Se usaron ratas macho normales, de 7-8 semanas de edad. Se evaluaron CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) de tipo silvestre recombinante. Una dosificación de 20 nmol/kg de cada péptido CNP en forma de una solución en manitol al 5 % se inyectó por vía intravenosa una vez en la dosis cola, o una dosificación de 50 nmol/kg de cada péptido CNP como una solución en 0,03 mol/l de solución tampón de ácido acético, pH 4,0, que contenía alcohol bencílico al 1 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v), se inyectó por vía subcutánea una vez en el lomo.

La inmunorreactividad de CNP en plasma se determinó con el RIA competitivo usando anticuerpo policlonal de conejo anti-CNP. Se prepararon muestras de patrón y de QC. Se añadieron cincuenta µl de las muestras de patrón, QC y de ensayo, respectivamente, a tubos de ensayo que contenían 50 µl de tampón de RIA. El anticuerpo policlonal de conejo anti-CNP diluido (100 µl) se añadió a los tubos. Todos los tubos se mantuvieron a 4 °C durante una noche. Se añadió una solución de ¹²⁵I-[Tyr⁰]-CNP22 (100 µl) y solución de IgG de conejo (100 µl) y se dejaron a aproximadamente 4 °C durante una noche. Se añadió un mililitro de suero de cabra de IgG anti-conejo que contenía un 10 % de polietilenglicol, se sometió a agitación vorticial y se dejó a aproximadamente 4 °C durante al menos 1 hora, y a continuación la fracción insoluble se precipitó por centrifugación. Después de la aspiración del sobrenadante, la cantidad de radiación (línea gamma) en el sedimento se midió con contador gamma. Cada muestra se midió por duplicado, y la media se adoptó como el valor determinado.

Las concentraciones de cGMP en plasma en la muestra a 5, 30, 60 y 90 minutos después de la dosificación i.v., o a los 5, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la dosificación s.c., se determinaron por el ensayo de RIA competitivo

usando utilizando anticuerpo monoclonal anti-cGMP. Se prepararon muestras de patrón. Se transfirieron 100 ul de las muestras de ensayo (soluciones patrón para la curva de calibración o las muestras de plasma diluidas para la determinación de cGMP) a tubos de ensayo. A continuación, a los tubos se añadieron 100 ul de solución de anticuerpo monoclonal anti-cGMP y en los tubos se añadieron 100 ul de solución de éster de metilo de succinil cGMP tirosina etiquetado con ¹²⁵I, respectivamente. Todos los tubos se mantuvieron a 4 °C durante una noche. Después de la adición de 500 ul de solución de carbón vegetal de dextrano, los tubos se sometieron a agitación vorticial y a continuación se colocaron en hielo durante 10 minutos. La mezcla de reacción se centrifugó y 500 ul del sobrenadante de cada muestra se transfirieron a un nuevo tubo de ensayo. La cantidad de radiación (línea gamma) en el sobrenadante se midió con un contador gamma. Cada muestra se midió por duplicado, y la media se adoptó como el valor determinado.

La inmunoreactividad de CNP en plasma se usó para el análisis farmacocinético (PK). El análisis PK se realizó usando WINNONLIN® Professional (Pharsight Corporation). Los perfiles de PK de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36 después de administración i.v. se calcularon usando parámetros de usando PK tales como concentración a 0 horas (C₀: extrapolación, pmol/ml), eliminación corporal total (CL_{tot}: ml/min/kg), volumen de distribución en estado estacionario (V_{dss}: ml/kg), área bajo la curva de concentración-tiempo en plasma (AUC: pmol-min/ml), tiempo medio de permanencia (MRT: min), y semivida (T_{1/2}: min). Los perfiles de PK de los péptidos CNP después de administración s.c. Se calcularon usando parámetros PK tales como concentración máxima en plasma (C_{máx}: pmol/ml), tiempo para alcanzar la C_{máx} (T_{máx}: min), área bajo la curva de concentración-tiempo en plasma (AUC: pmol-min/ml), tiempo medio de permanencia (MRT: min), y semivida (T_{1/2}: min).

En experimentos de recuperación con adicciones de plasma, el RIA detectó CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) del mismo modo (los datos no se muestran).

Para estudiar en ratones los perfiles de PK de CNP22 y sus variantes y su capacidad para estimular la producción de cGMP se usan procedimientos similares a los descritos anteriormente.

Los perfiles PK de CNP22, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) después de administración i.v. en tres ratas se ilustran en la Figura 44. Como se muestra en la Figura 45, CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) mostraban una semivida mucho más larga y una biodisponibilidad mucho mayor que CNP22. La semivida, T_{1/2} (min), era 1,42 (± 0,45) para CNP22, 22,3 (± 1,5) para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), y 49,5 (± 28,0) para CNP37. El área bajo la curva, AUC (pmol-min/ml), era 320 (± 54) para CNP22, 1559 (± 568) para CNP37, y 2084 (± 424) para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36).

Los perfiles de PK de los tres péptidos CNP después de administración s.c. en tres ratas se representan en la Figura 46. En comparación con CNP22, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) presentada una semivida mucho más larga (78,1 min (± 16,4) con respecto a 10,0 (± 4,0)) y una biodisponibilidad mucho mayor (60 % (± 6 %) con respecto a 19 % (± 9 %)).

Los cursos de tiempo de concentraciones de cGMP en plasma después de administración i.v. de los tres péptidos CNP en tres ratas se muestran en la Figura 47. La Figura 47 demuestra claramente que la administración i.v. de CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) daba como resultado niveles de cGMP en plasma mucho más elevados a los 30, 60 y 90 minutos que la administración i.v. de CNP22.

Los perfiles de tiempo de concentraciones de cGMP en plasma después de administración s.c. de los tres péptidos CNP en tres ratas se muestran en la Figura 48. La administración subcutánea de PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) y CNP37 también daba como resultado concentraciones de cGMP en plasma sustancialmente más elevadas que la administración s.c. de CNP22, con la diferencia relativa con respecto a CNP22 aumentando con el tiempo para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36), pero disminuyendo con el tiempo para CNP37.

Los estudios en ratas indican que, en comparación con wtCNP22, las variantes CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) de CNP mostraban una semivida sustancialmente más larga *in vivo*, mostraban una biodisponibilidad sustancialmente mayor *in vivo*, y estimulaban niveles sustancialmente más elevados de producción de cGMP *in vivo* durante un periodo de tiempo prolongado. La resistencia de CNP37 y PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) a la degradación de NEP se correlaciona con una semivida en plasma más prolongada *in vivo*, que a su vez se correlaciona con una señalización prolongada de NPR-B/cGMP *in vivo*. Estos resultados muestran que, en comparación con CNP22, las variantes de CNP de la divulgación, administradas por inyección i.v. o s.c. (por ejemplo, una vez al día), pueden ser más eficaces para tratar afecciones o trastornos sensibles a CNP, tales como relacionados con los huesos y trastornos del músculo liso vascular.

Ejemplo 11

Estudio de farmacocinética en ratones

Para determinar las variantes de CNP que tienen un aumento de la resistencia a NEP, para estudio de eficacia en ratones FGFR3^{ac} (véase el Ejemplo 13), se realiza un estudio de farmacocinética (PK) que compara las propiedades

farmacocinéticas de las variantes de CNP para CNP22 de tipo silvestre. El ratón FGFR3^{ac} es un modelo de ratón mutante de acondroplasia leve, que contiene un solo transgén en un antecedente de ratones FVB.

5 El CNP22 de tipo silvestre o variante del mismo se administra como una sola dosis intravenosa (i.v.) en ratones FVB de tipo silvestre de 6 semanas de edad. Los estudios de PK a modo de ejemplo se realizaron usando wtCNP22. A los ratones FVB/N de seis semanas de edad se les administró wtCNP22 por vía intravenosa en una sola dosis a 100 nmol/kg. Los niveles medios de CNP22 en plasma se calcularon, y se determinó que la semivida de CNP22 calculada era de 0,76 min a 1,03 min.

10 Se espera que las variantes de CNP que presentan una resistencia mayor a la degradación con NEP presenten un aumento de las concentraciones en suero con el tiempo y una semivida *in vivo* más larga.

Ejemplo 12

15 Eficacia de las variantes de CNP en ratones de tipo silvestre

Los efectos *in vivo* de las variantes de CNP en el crecimiento óseo se evaluaron en ratones de tipo silvestre. Los ratones macho de tipo silvestre FVB de tres semanas de edad recibieron diariamente una inyección subcutánea (s.c.) De cualquiera del vehículo, G-CNP37 (200 nmol/kg) o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36) (200 nmol/kg) durante 5 semanas. El peso corporal se midió al menos una vez a la semana. La longitud de la cola se midió al menos una vez a la semana usando un lector de calibrador digital, y la longitud corporal (longitud naso-anal), longitud ósea (tibia, fémur, cúbito y húmero), longitud del cráneo (segmento craneal anterior a posterior) y la longitud de la vértebra lumbar 5 (LV5) se midieron después de 5 semanas de tratamiento usando un calibrador. Los rayos X se realizaron en la medida inicial y después de 5 semanas de tratamiento.

25 Un tratamiento de cinco semanas de los ratones de tipo silvestre con G-CNP37 dio como resultado un aumento de peso corporal significativo, con un aumento del peso corporal siendo observado comenzando el Día 9 ($p < 0,05$) (Figura 49). El tratamiento con G-CNP37 también dio como resultado un aumento significativo en la longitud de la cola, que comienza en la segunda semana después del tratamiento ($p < 0,01$) (Figura 50).

30 La Tabla 10 muestra el porcentaje de cambio en la longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), longitud del cráneo (segmento craneal anterior a posterior), longitud desde el hueso (fémur, tibia, húmero y cúbito), y longitud de la vértebra lumbar 5 (LV5) en ratones de tipo silvestre inyectados por vía s.c. una vez al día con 200 nmol/kg de cualquiera de G-CNP37 o PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36) durante 5 semanas, con respecto a un valor de un 100 % para ratones de tipo silvestre tratados solamente con vehículo.

Tabla 10

	Cola	Naso-Anal	Anterior a Posterior (Cráneo)	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito	LV5
G-CNP37	119 %**	114 %**	104 %*	109 %**	105 %**	104 %**	101 %	108 %*
CNP27-PEO12	101 %	104 %**	101 %	102 %*	100 %	102 %*	96 %*	103 %
**p < 0,01, *p < 0,05								

40 El tratamiento con G-CNP37 dio como resultado un aumento significativo de la longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), longitud del cráneo, longitud del hueso proximal (fémur y húmero), longitud del hueso distal (tibia), y longitud vertebral (vértebra lumbar 5) en comparación con el tratamiento con vehículo.

45 Las dosis más bajas de Pro-Gly-CNP37 dosificado diariamente s.c. a 5 nmol/kg, 20 nmol/kg o 70 nmol/kg durante cinco semanas dieron como resultado un aumento dependiente de la dosis de la longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), y longitudes óseas en comparación con el vehículo. La Tabla 11 muestra el porcentaje de cambio en longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), y longitudes óseas (fémur, tibia, húmero y cúbito) en ratones de tipo silvestre inyectados s.c. una vez al día con 5 nmol/kg, 20 nmol/kg o 70 nmol/kg Pro-Gly-CNP37 durante 5 semanas, con respecto a un valor de un 100 % para ratones de tipo silvestre tratados solamente con vehículo.

Tabla 11

	Cola	Naso-Anal	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito
5 nmol/kg	107,6 %**	102,7 %**	103,3 %**	101,7 %**	101,1 %	100,9 %*
20 nmol/kg	107,8 %**	107,6 %**	107,1 %**	103,4 %**	102,3 %**	102,5 %**

	Cola	Naso-Anal	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito
70 nmol/kg	113,6 %**	112,5 %**	109,3 %**	104,9 %**	103,6 %**	104,1 %**
**p < 0,01, *p < 0,05						

En otro estudio, diversos regímenes de dosificación de Pro-Gly-CNP37 se administraron durante nueve semanas seguido de una semana de recuperación. Los ratones FVB de tipo silvestre se dosificaron s.c. con:

- 5 (1) vehículo diariamente durante nueve semanas, seguido de una semana de recuperación;
- (2) 20 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 diariamente durante una semana, seguido de tres dosis a la semana durante ocho semanas y una semana de recuperación;
- (3) 20 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 en semanas alternativas; o
- 10 (4) 5 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 diariamente durante nueve semanas seguido de una semana de recuperación.

El aumento del crecimiento en la growth en longitud de la cola, longitud corporal, y longitudes óseas se observó en todos los grupos de tratamiento (Grupos 2, 3 y 4) al final del estudio. La Tabla 12 muestra el porcentaje de cambio en la longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), y longitudes óseas (fémur, tibia, húmero y cúbito) en ratones de tipo silvestre a los que se administra Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") en los regímenes de dosis descritos anteriormente, con respecto a un valor de un 100 % para ratones wt (de tipo silvestre) tratados solamente con vehículo.

Tabla 12

	Pro-CNP38 Total recibido (nmol/kg)	Cola	Naso-Anal	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito
Grupo 2	620	104,8 %**	106,0 %**	104,3 %**	100,8 %	102,5 %	101,7 %
Grupo 3	700	106,7 %**	106,5 %**	104,1 %**	102,5 %**	102,6 %*	102,8 %*
Grupo 4	350	104,9 %**	104,1 %**	107,3 %**	102,7 %**	102,3 %**	103,6 %**
**p < 0,01, *p < 0,05							

20 Aunque todos los regímenes de dosis de Pro-Gly-CNP37 aumentaban los parámetros de crecimiento axial y apendicular medidos, la dosificación diaria de Pro-Gly-CNP37 estimulará el crecimiento apendicular (fémur, tibia, húmero y cúbito) a un nivel de dosis total más bajo (Grupo 4) en comparación con los regímenes con una dosificación menos frecuente (Grupos 2 y 3).

25 Ejemplo 13

Eficacia en modelo de ratón de acondroplasia leve

30 La eficacia de las variantes de CNP para aumentar el crecimiento y corregir la acondroplasia se sometió a ensayo en un modelo del ratón de acondroplasia leve, usando una cepa de ratones transgénicos que expresaban en de FGFR-3 humano con una mutación G380R (FGFR3^{ac}) (Wang *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96 (8): 4455-4460 (1999); Naski *et al.*, Development USA, 125: 4977-4988 (1998); Patentes de Estados n.º 6.265.632 y 6.136.040).

35 A las 3 semanas de edad, los ratones FGFR3^{ac} y sus compañeros de camada de tipo silvestre se anestesiaron para tomar imágenes de rayos X de cuerpo completo laterales tomadas con Faxitron y se asignaron al azar por peso corporal en los siguientes grupos de tratamiento (n = 8/grupo): (1) tipo silvestre/vehículo, (2) FGFR3^{ac}/vehículo, (3) FGFR3^{ac}/CNP37, y (4) FGFR3^{ac}/PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36). Los ratones recibieron una administración subcutánea (s.c.) una vez al día del artículo de ensayo designado (vehículo o 200 nmol/kg de la variante de CNP) durante 5 semanas. Se usaron grupos satélite (n = 3) para confirmar la exposición de cada artículo de ensayo después de una única administración subcutánea el Día 1. Los ratones FVB macho de tipo silvestre que recibieron inyección s.c. diaria de vehículo durante 5 semanas se usaron como control para el crecimiento normal.

45 Se realizaron mediciones de rayos X en la medida inicial y al final del estudio para determinar el cambio en la longitud de la cabeza, área del cráneo y conducto auditivo externo (EAM, el canal auditivo que va desde el oído externo hasta el oído medio). El peso corporal y la longitud de la cola se midieron al menos una vez a la semana, usando un calibrador digital para medir la longitud de la cola, y longitud corporal (naso-anal) se midió después de 5 semanas de tratamiento. Las longitudes del hueso (tibia, fémur, cúbito y húmero) se midieron usando un calibrador digital en la necropsia.

50 El Día 37, todos los ratones se sacrificaron con anestesia terminal y se hicieron fotografías de todo el animal y se tomaron imágenes de rayos X con Faxitron. La tibia izquierda y derecha, fémur, húmero, y cúbito se recogieron y se

midieron usando un calibrador digital. Las porciones izquierdas de cada hueso se procesaron para histología, y las porciones derechas se congelaron con fines de archivo. Las muestras obtenidas de los huesos se usaron para evaluar los efectos de las variantes de CNP en el crecimiento óseo endocondral.

- 5 El tratamiento de los ratones FGFR3^{ac} con CNP37 mediante una única inyección s.c. diaria durante 5 semanas dio como resultado un aumento significativo de la longitud corporal (Figura 51), longitud de la cola (Figura 52), longitudes del hueso distal (Figuras 53A y B) y longitudes del hueso proximal (húmero y fémur) (Figuras 54A y B). Por otra parte, el tratamiento con CNP37 aumentó la longitud de la cabeza (Figura 56), área del conducto auditivo externo (Figura 57), y longitud de la espina dorsal (Figura 58) a través de la extensión de los cuerpos vertebrales.
- 10 Además, el tratamiento con CNP37 corregía la rizomelia (desproporción de la longitud de las extremidades proximales) de los ratones FGFR3^{ac}, es decir, restablecía el crecimiento proporcional de los huesos proximales, tal como se evalúa con la proporción de fémur:tibia (Figura 55). La Tabla 13 resume el porcentaje de cambio en la longitud de la cola, longitud corporal (naso-anal), y longitudes del hueso (fémur, tibia, húmero y cúbito) en los ratones FGFR3^{ac} inyectados s.c. una vez diariamente con 200 nmol/kg de cualquiera de CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36) durante 5 semanas, con respecto a un valor de un 100 % para los ratones FGFR3^{ac} tratados solamente con vehículo.

Tabla 13

	Cola	Naso-Anal	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito
CNP37	115 %**	109 %**	112 %**	107 %**	105 %*	106 %**
CNP27-PEO24	100 %	99 %	100 %	102 %	100 %	101 %
**p < 0,01, *p < 0,05						

- 20 Los resultados de estos estudios muestran que CNP37 puede estimular el crecimiento del hueso espinal y largo, ayudar a corregir la rizomelia al aumentar preferentemente la longitud del fémur con respecto a la tibia, y ayudar a restablecer las proporciones craneofaciales en ratones FGFR3^{ac}. Estos resultados indican que CNP37 y potencialmente otras variantes de CNP pueden ser eficaces para corregir los síntomas de acondroplasia y tratar a sujetos con defectos de crecimiento óseo o con necesidad de aumento de crecimiento óseo.

25 Ejemplo 14

Medición de biomarcadores y evaluación de la inmunogenicidad en ratones acondroplásicos de tipo silvestre

30 Medición de biomarcadores después de la administración de CNP

Los niveles de biomarcadores de crecimiento óseo se midieron en ratones de tipo silvestre y acondroplásicos (FGFR3^{ac}).

- 35 Los ratones FVB FGFR3^{ac} transgénicos (un modelo de ratón de acondroplasia leve) se trataron diariamente durante 5 semanas por inyección subcutánea con cualquiera de vehículo (tampón 30 mM de ácido acético/acetato, alcohol bencílico al 1 %, sacarosa al 10 %, pH 4,0), CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36) a 200 nmol/kg para cada compuesto de CNP, como se ha descrito anteriormente. Durante el estudio se recogieron plasma y suero. El plasma cosechado se almacenó con inhibidor de proteasa 10x a -80 °C hasta su análisis. Los niveles de cGMP se midieron 15 minutos después de la inyección en el Día 36 a partir de los tubos de recogida de plasma con K2-ETDA. Los fragmentos de colágeno de tipo II escindido (biomarcadores asociados a cartilagos), osteocalcina (biomarcador asociado a hueso) e IgG (que se relaciona con la inmunogenicidad) se midieron a partir de suero de sangrado terminal al final del estudio (Día 37). El cGMP se midió usando un kit de ELISA disponible en el mercado (Cayman Chemical Co., n.º de Cat. 581021.1), el colágeno de tipo
- 40 II escindido (Cartilaps) se midió usando un kit disponible en el mercado en Immunodiagnostic Systems (n.º de Cat 3CAL4000), y la osteocalcina se midió usando un kit disponible en el mercado en Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, Massachusetts).

- 50 La Figura 59 muestra un aumento en los niveles plasmáticos de cGMP en ratones FGFR3^{ac} tratados con CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en comparación con el vehículo. Las Figuras 60 y 61 muestran que la administración de CNP37 daba como resultado la mayor elevación de los niveles en suero de colágeno de tipo II escindido y osteocalcina. Estos resultados indican que la administración de los péptidos CNP, en particular el CNP37, a ratones FGFR3^{ac} conducía a un aumento de los niveles de marcadores de crecimiento óseo, lo que sugiere un aumento de la formación ósea en ratones FGFR3^{ac} tratados con péptido CNP.

- 55 Para la evaluación de biomarcadores en ratones de tipo silvestre, los ratones FVB de tipo silvestre se trataron diariamente durante 5 semanas mediante inyección subcutánea con cualquiera de vehículo (tampón 30 mM de ácido acético/acetato, alcohol bencílico al 1 %, sacarosa al 10 %, pH 4,0), 200 nmol/kg de G-CNP37, 200 nmol/kg de PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID NO: 36), o 20 nmol/kg o 70 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37,

Durante el estudio se recogieron plasma y suero. El plasma cosechado se almacenó con inhibidor de proteasa 10x a -80 °C hasta su análisis. Los niveles de cGMP se midieron 15 minutos después de la inyección en el Día 36 a partir de los tubos de recogida de plasma con K2-ETDA. Los niveles de colágeno de tipo II escindido, fosfatasa alcalina específica de hueso e y IgG (que se relaciona con la inmunogenicidad) se midieron a partir de suero de sangrado terminal al final del estudio (Día 37). El cGMP y colágeno de tipo II escindido (Cartilaps) se midieron como se ha descrito anteriormente. La fosfatasa alcalina específica de hueso se midió usando un kit disponible en el mercado (Cusabio, n.º de Cat. CSB-E11914m).

La administración de G-CNP37 aumentaba de forma significativa ($p < 0,05$) el nivel de cGMP (Figura 62) y en particular el nivel de los fragmentos de colágeno de tipo II escindido (Figura 63) en ratones de tipo silvestre en comparación con el vehículo. El nivel significativamente más elevado de los fragmentos de colágeno de tipo II resultantes de la administración de G-CNP37 indica la renovación de la matriz de cartílago, lo que sugiere que G-CNP37 estimulaba la formación de hueso nuevo en el crecimiento de huesos en ratones de tipo silvestre.

Las dos dosis de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38"), 20 y 70 nmol/kg, aumentaban de forma significativa ($p < 0,05$) el nivel plasmático de cGMP 15 minutos después de su administración en comparación con ratones de tipo silvestre tratado con vehículo (Figura 64). La administración de la dosis más elevada (70 nmol/kg) de Pro-Gly-CNP37 también aumentaba de forma significativa ($p < 0,05$) el nivel de colágeno de tipo II escindido en comparación con ratones tratados con vehículo (Figura 65), lo que sugiere que la dosis más elevada de Pro-Gly-CNP37 estimulaba la renovación de la matriz de cartílago antes de la nueva formación ósea en ratones de tipo silvestre. Además, la administración de la dosis más elevada (70 nmol/kg) de Pro-Gly-CNP37 aumentaba ($p < 0,05$) el nivel de fosfatasa alcalina específica de hueso en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 66), lo que sugiere que la dosis más elevada de Pro-Gly-CNP37 aumentaba la remodelación ósea en ratones de tipo silvestre.

Evaluación de la inmunogenicidad de variantes de CNP

Dado que las variantes de CNP son derivados peptídicos, es posible que la administración de los péptidos pueda conducir a una respuesta inmunogénica *in vivo*. Para evaluar si se producía una respuesta inmunológica después de sucesivas administraciones de variante de CNP, se realizó la medición de los niveles de anticuerpos en suero.

Se realizó un ensayo de IgG para evaluar si una respuesta inmunológica de IgG se desencadenaba por exposición de 5 semanas de ratones FGFR3^{ac} acondroplásicos a CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID NO: 36). La IgG es la inmunoglobulina más predominante en suero de ratón y humano y se produce como parte de la respuesta inmunológica secundaria a un antígeno. La respuesta de IgG a la administración de los péptidos CNP se determinó como sigue a continuación. Las placas de 96 pocillos se revistieron con 100 ng/ml CNP22, CNP37 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) en tampón BupH PBS (Pierce/Thermo, n.º de Cat. 28372, Rockford, Illinois). Después de incubación durante una noche, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo de Caseína-PBS (Pierce/Thermo, n.º de Cat. 37528) durante dos horas a temperatura ambiente con agitación a 300 rpm. Después de lavar con tampón de lavado (1x PBS con Tween al 0,05 %), las muestras de suero diluidas de un sangrado terminal (diluida a 1:25) se añadieron a la placa. Los controles positivo y negativo también se cargaron en la placa. El control positivo era suero diluido a 1:25 (combinado a partir de 6 ratones FVB individuales) con anticuerpo anti-CNP22 añadido (IgG anti-CNP22 de conejo de Bachem, n.º de Cat. T-4222) a una dilución a 1:1000. El control negativo era el suero combinado diluido. Después de dos horas de incubación, las placas se lavaron y el anticuerpo secundario diluido en tampón de bloqueo se añadió a los pocillos. Para las muestras de suero de ratón, Fcγ de IgG anti-ratón (conjugada con IgG anti-ratón de cabra purificada por afinidad conjugada con peroxidasa, fragmento de Fcγ, n.º de Cat. 115-035-071, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania) se añadió a una dilución a 1:10.000. Para los controles negativos y positivos, se añadió IgG-HRP anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, n.º de Cat. SC-2004, Santa Cruz, California) al tampón de bloqueo. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente con agitación a 300 rpm, las placas se lavaron con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de TMB (One-step TMB, Pierce/Thermo, n.º de Cat. 34022) a todos los pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación a 300 rpm. Las reacciones colorimétricas se interrumpieron mediante la adición de 100 ul de H₂SO₄ 2 N. Las placas se leyeron a 450 nm (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, California) y los datos se analizaron usando el software SoftMax Pro (Molecular Devices).

Las muestras de suero de ratones FGFR3^{ac} tratados con CNP22 o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) no indicaron respuesta inmunológica de IgG positiva en ninguno de los ratones. Solamente uno de los nueve ratones FGFR3^{ac} tratados con CNP37 mostró una respuesta a IgG ligeramente positiva.

La respuesta inmunogénica de ratones de tipo silvestre a los que se administra G-CNP37, PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) o Pro-Gly-CNP37, tal como se mide mediante un aumento en el nivel de IgG en suero, también se evaluó examinando las muestras de suero de sangrado terminal como se ha descrito anteriormente. Ninguno de las ratones de tipo silvestre tratados con PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID NO: 36) o Pro-Gly-CNP37 (20 o 70 nmol/kg) presentaba una respuesta inmunológica a IgG positiva, y solamente uno de seis ratones de tipo silvestre a los que se administró G-CNP37 mostraba una respuesta a IgG ligeramente positiva.

Medición de biomarcadores bajo diferentes regímenes de dosificación de CNP

Los ratones FVB de tipo silvestre se trataron diariamente durante 9 semanas mediante inyección subcutánea (s.c.) de vehículo (tampón 30 mM de ácido acético/acetato, alcohol bencílico al 1 %, sacarosa al 10 %, pH 4,0) o Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") bajo diferentes regímenes de dosificación. El Grupo 1 incluía a los ratones tratados con vehículo inyectados s.c. diariamente durante 9 semanas seguido de 1 semana sin tratamiento. El Grupo 2 incluía ratones tratados con Pro-Gly-CNP37 (20 nmol/kg) una de alegría durante 1 semana, seguido de tres dosis a la semana durante 8 semanas, seguido de 1 semana sin tratamiento. El Grupo 3 contenía ratones tratados con Pro-Gly-CNP37 (20 nmol/kg) una vez al día en semanas alternas (semanas 1, 3, 5, 7 y 9), con 1 semana sin tratamiento después de cada semana de tratamiento. El Grupo 4 contenía ratones tratados con Pro-Gly-CNP37 (5 nmol/kg) una vez al día durante 9 semanas seguido de 1 semana sin tratamiento. Por último, el Grupo 5 incluía ratones tratados con Pro-Gly-CNP37 (5 nmol/kg) una vez al día durante 5 semanas sin ninguna semana sin tratamiento. El suero de sangrado terminal se recogió de los ratones, y que a partir del mismo se determinaron los niveles de colágeno de tipo II escindido, fosfatasa alcalina total y niveles totales de anticuerpos. Los niveles de colágeno de tipo II escindido se midieron como se ha descrito anteriormente. Los niveles de fosfatasa alcalina total, predominantemente del hígado y de los huesos, se midieron con la ayuda de una instalación de ensayo de laboratorio de diagnóstico veterinario (Antech).

Se desarrolló un ensayo de anticuerpo total para evaluar la respuesta inmunológica potencial. La plataforma usada para el ensayo de anticuerpo total fue un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECLA). La plataforma ECLA usa un fármaco etiquetado con biotina (en el presente documento, biotina-Pro-Gly-CNP37) y un fármaco etiquetado con rutenio (en el presente documento, Ru-Pro-Gly-CNP37). El fármaco etiquetado con biotina se une a una placa revestida con estreptavidina que contiene electrodos, y el fármaco etiquetado con rutenio funciona como el componente de detección del ensayo, ya que el rutenio se puede estimular por vía electroquímica. Un anticuerpo específico de fármaco (en el presente documento, un anticuerpo específico de CNP) se une al fármaco etiquetado con biotina y el fármaco etiquetado con rutenio y "une por puente" a los dos fármacos etiquetados. Entre las ventajas de la plataforma ECLA, se puede detectar cualquier isotipo de anticuerpo (IgG, IgM, etc.) y el ensayo de ECLA es independiente de la especie.

El análisis de anticuerpo total se realizó como sigue a continuación. Pro-Gly-CNP37 se etiquetó con biotina en una proporción de estimulación de 4:1, y Pro-Gly-CNP37 también se etiquetó por separado con rutenio en una proporción de estimulación de 10:1. Ambas reacciones de etiquetado separadas se interrumpieron mediante la adición de glicina, y las muestras de ambas reacciones se intercambiaron en tampón con PBS. Los QC bajo y elevado se prepararon usando anticuerpo anti-CNP22 disponible en el mercado (IgG anti-CNP22 de conejo de Bachem, n.º de Cat. T-4222) añadidos a concentraciones bajas y elevadas de suero de ratón FVB diluido al 5 %. Las muestras de suero de ratón se diluyeron hasta un 5 % usando diluyente de ensayo (BSA al 5 % en PBS, MSD n.º de Cat. R93AA-1). Se preparó una solución de trabajo añadiendo Pro-Gly-CNP37 etiquetado con biotina para someter a ensayo el diluyente, añadiendo a continuación Pro-Gly-CNP37 etiquetado con rutenio para someter a ensayo el diluyente, y a continuación combinando las dos soluciones juntas. Veinticinco ul de QC bajo y elevado se cargaron en la placa como controles. A continuación, se añadieron 25 ul de la muestra a una placa de 96 pocillos de no unión, seguido de la adición de 50 ul de solución de trabajo a todos los pocillos. Las muestras y los QC se incubaron con la solución de trabajo a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación a 350 rpm. Mientras tanto, una placa de estreptavidina de MSD (n.º de Cat. de MSD L13SA-1) se bloqueó con tampón de bloqueo (n.º de Cat. de MSD R93AA-1) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación a 350 rpm. Al final de la incubación de dos horas, la placa de estreptavidina de MSD se lavó, y a continuación se transfirieron 50 ul de muestra o QC a la placa de MSD. A continuación, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación a 350 rpm. Al final de la incubación de 1 hora, la placa de MSD se lavó y se añadieron 150 ul de tampón de lectura 2x (n.º de Cat. de MSD R92TC-2) a la placa. La placa se leyó usando una máquina PR400 de MSD.

Los cinco grupos de ratones mostraban niveles de colágeno de tipo II escindido sustancialmente comparables (Figura 67). El tratamiento de los ratones en el Grupo 5 con 5 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 una vez al día durante 5 semanas aumentaban de forma significativa ($p < 0,001$) el nivel de fosfatasa alcalina total (Figura 68), lo que es indicativo de remodelación ósea. Las muestras de suero de cada uno de los cuatro grupos de ratones tratados con Pro-Gly-CNP37 no mostraban una respuesta de anticuerpo positiva en el ensayo de anticuerpo total.

Sin quedar ligado por ninguna teoría, existen posibles explicaciones de por qué los cuatro grupos de ratones tratados con CNP no mostraban una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de colágeno de tipo II escindido en comparación con los ratones tratados con vehículo y por qué solo los ratones tratados con CNP en el Grupo 5 mostraban un aumento estadísticamente significativo en la fosfatasa alcalina total en comparación con los ratones tratados con vehículo. Es posible que debido a que los ratones tratados con vehículo en el estudio también estaban creciendo, el colágeno de tipo II escindido y la fosfatasa alcalina, que son biomarcadores de crecimiento, también se producían en los ratones tratados con vehículo. Además, hubo un periodo de una semana sin tratamiento para los ratones en cada uno de los Grupos 1 a 4, que posiblemente diluían a eliminación cualquier cambio en los niveles de colágeno de tipo II escindido y de fosfatasa alcalina total entre los ratones tratados con CNP en los Grupos 1-3 y los ratones tratados con vehículo. No hubo periodo sin tratamiento para los ratones tratados con CNP en el Grupo 5, y esos ratones mostraban un nivel de fosfatasa alcalina total significativamente

mayor ($p < 0,001$) en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Ejemplo 15

5 Respuestas a la dosis de las variantes de CNP en ratones

Los efectos de dosis variables de las variantes de CNP se evaluaron en ratones FVB de tipo silvestre.

10 Para el estudio de la dosis, en dos estudios separados (S1 y S2), a los grupos de 10 ratones se administró Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") a 20 y 70 nmol/kg por vía subcutánea una vez al día para 36 inyecciones. La longitud de la cola y el peso corporal se midieron durante el transcurso del tratamiento. Los animales se sacrificaron al final del experimento y la longitud ósea se evaluó.

15 La longitud de la cola de los animales tratados con vehículo tenía aproximadamente 8 cm en el día 36, mientras que los animales tratados con 20 nmol/kg de Pro-CNP38 presentaban una longitud de la cola de aproximadamente 8,75 cm y 70 nmol/kg de Pro-CNP38 aumentó la longitud de la cola hasta aproximadamente 9,5 cm. La administración de Pro-CNP38 en cualquier dosis induce un aumento relativo significativo ($p < ,05$) en la longitud total del cuerpo en comparación con los animales tratados con control, lo que demuestra aproximadamente un 130 % de aumento en la velocidad de crecimiento a 20 nmol/kg y aproximadamente un 160 % de aumento en la velocidad de crecimiento a 20

20 70 nmol/kg de Pro-CNP38 (Figura 69).
El tratamiento con Pro-CNP 38 también aumentaba la longitud de hueso de forma significativa en la mayoría de los huesos largos evaluados así como la longitud naso-anal (longitud del cuerpo) del animal. La Tabla 14 es representativa del % de aumento relativo de la longitud de hueso en animales tratados en comparación con animales tratados con vehículo.

Tabla 14

Pro-CNP38	Cola	Naso-Anal	LV4-6	Fémur	Tibia	Húmero	Cúbito
20 nmol/kg	8 %*	7 %*	10 %*	7 %*	4 %*	3 %*	3 %
70 nmol/kg	16 %*	13 %*	13 %*	10 %*	7 %*	4 %*	5 %*
% de aumento relativo, * $p < 0,05$ ANNOVA (ensayo de Dunnett) con respecto a vehículo							

30 La densidad mineral del hueso (BMD) y el contenido de mineral del hueso (BMC) también se evaluaron después de la administración de Pro-CNP38 a diferentes dosis. Los resultados (Figura 70) mostraban que la administración de Pro-CNP38 a 70 nmol/kg disminuía de forma significativa la densidad mineral del hueso (Figura 70A) y aumentaba el contenido de mineral del hueso (Figura 70B), lo que sugiere que existe un retraso en la mineralización del hueso en animales tratados, pero el proceso de mineralización por sí mismo no se ve influido de forma adversa por el tratamiento con CNP.

35 No se produjeron cambios significativos en el peso de los órganos entre animales tratados con Pro-CNP38 o con vehículo.

40 Estudios bioanalíticos de respuesta a la dosis en ratones

Los estudios bioanalíticos se realizaron para medir marcadores de actividad de CNP después de administración *in vivo* de dosis variables de Pro-CNP38. Los niveles en plasma de cGMP, niveles en suero de colágeno de tipo II y niveles en suero de fosfatasa alcalina a partir de muestras *in vivo* se analizaron. A los ratones de tipo silvestre se les administraron 20 y 70 nmol/kg de Gly-wtCNP37 ("CNP38"), 20 y 70 nmol/kg de Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") y 45 70 y 200 nmol/kg de GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("HSA-CNP27") (SEQ ID NO: 144) por vía subcutánea una vez al día durante 36 días. El plasma se recogió 15 minutos después de la última inyección el día 36 y los ratones se sacrificaron 24 h más tarde. En el momento del sacrificio, el suero del sangrado terminal se recogió y se usó para análisis de biomarcador como se ha descrito anteriormente.

50 La Figura 71 muestra que 20 nmol/kg CNP38 y 70 nmol/kg HSA-CNP27 aumentaban de forma significativa el cGMP en plasma ($p < 0,01$), aumentaban los niveles de cGMP en plasma a aproximadamente 300 pmol y 400 pmol, respectivamente. La administración de 70 nmol/kg CNP38 aumentaba cGMP a aproximadamente 500 pmol ($p < 0,01$), mientras que la administración de 70 nmol/kg de Pro-CNP38 aumentaba cGMP a aproximadamente 575 pmol ($p < 0,001$). La administración de 200 nmol/kg HSA-CNP27 aumentaba cGMP a aproximadamente 675 pmol 55 ($p < 0,001$).

Las variantes de CNP también aumentaban de forma significativa los niveles en suero de colágeno de tipo II escindido (Figura 72). El CNP38 a 20 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 9 pg/ml ($p < 0,05$), CNP38 a 70 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 8 pg/ml ($p < 0,05$), Pro-CNP38 a 20 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 12 pg/ml ($p < 0,05$), Pro-CNP38 a 70 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 16 pg/ml ($p < 0,05$), HSA-CNP27 a 70 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 10 pg/ml, y HSA-CNP27 a 200 nmol/kg aumentaba el colágeno a aproximadamente 10 pg/ml ($p < 0,05$).

Los niveles de fosfatasa alcalina (AP) en suero también aumentaban después de la administración de las variantes de CNP (Figura 73). El CNP38 a 20 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 130 IU/l, CNP38 a 70 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 160 IU/l ($p < 0,001$), Pro-CNP38 a 20 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 155 IU/l ($p < 0,001$), Pro-CNP38 a 70 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 180 IU/l ($p < 0,001$), HSA-CNP27 a 70 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 120 IU/l, y HSA-CNP27 a 200 nmol/kg aumentaba la AP a aproximadamente 140 IU/l ($p < 0,01$). La Tabla 15 ilustra el porcentaje de AP total que es específica de hueso.

Tabla 15

	IU/l de AP Total	IU/l de AP específico de hueso	% de Fos Alc Total
Vehículo	109,8	24,7	22,5
CNP38 (20 nmol/kg)	134,9	47,9	34,2
CNP38 (70 nmol/kg)	166,3	63,5	38,2
Pro-CNP38 (20 nmol/kg)	159,9	64,9	41,2
Pro-CNP38 (70 nmol/kg)	183,6	78,4	42,7
HSA-CNP27 (20 nmol/kg)	121,4	51,7	42,6
HSA-CNP27 (70 nmol/kg)	136,1	76,5	56,2

El análisis de anticuerpos anti-CNP mostraba que solamente HSA-CNP27 provocaba una respuesta de anticuerpo de IgG en ratones.

Los resultados mencionados anteriormente ilustran que la administración de las variantes de CNP aumenta la concentración de colágeno de tipo II y fosfatasa alcalina en suero, lo que indica que CNP aumenta los factores relevantes para un aumento del crecimiento del hueso, y sugieren que la administración de las variantes de CNP a dosis tan bajas como 20 nmol/kg son eficaces para aumentar el crecimiento del hueso *in vivo*.

Respuesta de cGMP después de diferentes regímenes de dosis

Los análisis bioanalíticos también se evaluaron en diferentes momentos después de la administración de Pro-GlywtCNP37 ("Pro-CNP38") a ratones CD-1 de tipo silvestre, 8 - 10 semanas de edad, ($n = 3$ por grupo de tratamiento). El Pro-CNP38 se proporcionó en una sola dosis subcutánea de 200 nmol/kg y los niveles de cGMP se midieron a los 15 minutos, 3 horas, 1 día, 2 días y 3 días después de la inyección en el plasma, epífisis, hueso cortical (médula ósea retirada), pulmón y cerebro. La sangre se recogió en K2EDTA. La epífisis tibial y femoral y hueso cortical, pabellón auricular, cerebros, riñones y pulmones se recogieron, se colocaron en agua hirviendo durante 5 minutos, a continuación se congelaron a -70 °C. Tanto el plasma como el tejido se sometieron a ensayo para cGMP (kit de ELISA de GMP cíclico de Cayman Chemical).

Los resultados mostraban que los niveles de cGMP aumentaban a los 15 minutos después de la inyección en plasma (aproximadamente 1300 pmol/ml) y epífisis (aproximadamente 2,5 pmol/ml/mg). Hacia las 3 horas, los niveles en plasma habían disminuido aproximadamente a los niveles de control, mientras que los niveles en la epífisis eran aproximadamente 3 veces más bajos que los niveles de cGMP a los 15 minutos después de la inyección, pero más elevados que los niveles de control. Los niveles de hueso cortical aumentaron a aproximadamente 0,5 pmol/ml/mg a los 15 minutos y permanecieron en este nivel a 3 horas. Los niveles de cGMP en todos los momentos volvieron a los niveles de control hacia 1 día después de la inyección. En el pulmón o en el cerebro se detectó de poco a ningún cGMP en ningún momento.

Los niveles de cGMP también se midieron en ratones a los que se administraron múltiples inyecciones de Pro-CNP38. A los grupos de ratones ($n = 3$) se les administró Pro-CNP38, sigue a continuación: 20 nmol/kg en una sola dosis, por vía subcutánea; 200 nmol/kg en una sola dosis, por vía subcutánea; 20 nmol/kg por vía subcutánea en los días 0 y 1; 200 nmol/kg por vía subcutánea en los días 0 y 1; 20 nmol/kg por vía subcutánea en los días 0 y 3; 200 nmol/kg por vía subcutánea en los días 0 y 3. Los ratones se sacrificaron 15 minutos después de la dosis final de Pro-CNP38 y los niveles en plasma de cGMP se analizaron. No parece que sea una modulación de la señal de

que cGMP en plasma debida a los regímenes de diferentes dosis. También se investigaron las respuestas de cGMP en el cartílago.

Evaluación de la sensibilización potencial del receptor NPR-B

El análisis histológico muestra que CNP, cuando se administra diariamente a 200 nmol/kg, se acumula en la placa de crecimiento de los animales, basándose en el aumento de inmunoreactividad de CNP. Es posible que esta acumulación, o la estimulación diaria del receptor de CNP, en la placa de crecimiento pueda desensibilizar al receptor de CNP.

Para determinar si la dosificación múltiple de sensibilizar al receptor NPR-B *in vitro*, se cultivaron condrocitos articulares humanos normales con Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") durante tiempos variables y se midió la secreción de cGMP.

Los condrocitos humanos normales primarios aislados de cartílago articular se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (Lonza). A una confluencia de un 60-80 %, los condrocitos se trataron con Pro-CNP38 1 uM dos veces, con periodos de tiempo crecientes entre tratamientos (el primer tratamiento en el momento 0, t a continuación a los 15 min, 30 min, 60 min, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs, 6 hrs después del tratamiento inicial). En el siguiente experimento, los tratamientos se aplicaron dos veces, con periodos de tiempo creciente entre tratamiento (el primer tratamiento en el momento 0, a continuación a las 6, 16, 24, 48 hrs después del tratamiento inicial) o solamente una vez, en paralelo con el segundo tratamiento (solamente en respuestas sin tratamiento previo de 6, 16, 24 y 48 hrs). Los tratamientos se aplicaron durante 15 min solamente (tratamiento agudo), o para la duración del experimento (tratamiento crónico cuando CNP se dejaba en el medio). Los lisados celulares y el medio acondicionado se recogieron y se analizaron para secreción de cGMP total (Molecular Devices ELISA).

En un experimento a corto plazo, las células se estimularon con Gly-wtCNP37 ("CNP38") 1 uM dos veces durante 15 minutos (tratamiento agudo), o dos veces con CNP38 durante todo el cultivo (tratamiento crónico). Los periodos entre tratamientos fueron 15 min, 30 min, 60 min, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs, y 6 h. La estimulación de cGMP máxima se obtuvo tratando las células solamente una vez, en el último momento del experimento, (6 horas; > 0,1 pmol/pocillo en el experimento agudo y 0,2 pmol/pocillo en el experimento crónico). En el experimento agudo, cuando las células se tratan dos veces, la respuesta disminuye a 0,1 pmol/pocillo si las células se tratan en el momento 0 y a continuación de nuevo a los 15 minutos. En el experimento agudo, cuando las células se tratan dos veces, la respuesta disminuye a aproximadamente 0,5 pmol/pocillo si las células se tratan en el momento 0 y de nuevo a los 30 min, 60 min, 2, 3, y 4 horas. En el experimento crónico, cuando las células se tratan dos veces, la respuesta disminuye a aproximadamente 0,16 pmol/pocillo si las células se tratan en el momento 0 y a los 15 minutos. En el experimento crónico, cuando las células se tratan dos veces, la respuesta disminuye a aproximadamente 0,6 pmol/pocillo si las células se tratan en el momento 0 y de nuevo a los 30 min, 60 min, o 2 horas. En el experimento crónico, cuando las células se tratan dos veces, la respuesta disminuye a < 0,5 pmol/pocillo si las células se tratan en el momento 0 y de nuevo a las 2, 4 o 6 horas.

También se realizaron estudios a largo plazo. Para el tratamiento agudo, se añadió CNP38 1 uM al cultivo celular como se ha descrito anteriormente. Para el tratamiento crónico, se añadió CNP38 1 uM al cultivo celular durante todo el experimento como se ha descrito anteriormente. Los resultados indican que el receptor NPR-B se puede desensibilizar después de administración repetida de CNP, diariamente *in vitro*, y 48 horas entre dosis es suficiente para recuperarse hasta un 60 % de la respuesta máxima de NPR-B con respecto a CNP38, si el CNP se retira después de la primera dosis, y a < 40 % si el CNP se incubaba durante todo el experimento (Figura 74).

Para evaluar si el tratamiento con una variante de CNP desensibiliza al receptor NPR-B *in vivo*, se realizaron experimentos con ratones de tipo silvestre. A los ratones CD-1 macho de 8-10 semanas de edad se les inyectó vehículo control o Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") por vía subcutánea a 200 nmol/kg en los días apropiados. A los ratones les inyectó Pro-CNP38 diariamente hasta 8 días, o se les inyectó Pro-CNP38 en el primer día, el primer y el segundo días, o el primer y el tercer días del estudio. Quince minutos después de la inyección final, los ratones (n = 3 por grupo de tratamiento) se anestesiaron profundamente y se exanguinaron a través de toracotomía y canulación aórtica. La sangre circulante se lavó abundantemente a partir del cuerpo con PBS a través de una cánula aórtica. Los riñones y las tibias derechos, fémures derechos y fémures izquierdos se recogieron, se hirvieron en agua durante 5 minutos y/o se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron en hielo seco o en un congelador a -70 °C hasta el ensayo de cGMP. Para el cálculo de la producción de cGMP en cartílago, se diseccionaron fémures distales y/o tibias proximales, se pesaron y se pulverizaron usando Covaris Cryoprep CP02. Las muestras en polvo se homogeneizaron usando un sonicador E210 de Covaris en ácido perclórico al 5 %, y se neutralizaron en KOH al 60 %. A continuación, las muestras centrifugaron a 10.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se usó para el ensayo de cGMP (Kit de Inmunoensayo Enzimático de GMP Cíclico, Cayman, Michigan). Además, las tibias izquierdas se recogieron, se fijaron en un 10 % formalina tamponada normal, y se guardaron para análisis inmunohistoquímico adicional.

La Figura 75A muestra que el tratamiento de y repetido de los ratones de tipo silvestre con 200 nmol/kg de Pro-CNP38 durante 1, 4, 6, 7 y 8 días nos dará como resultado la desensibilización de la respuesta de cGMP. Por el

contrario, la potenciación de la respuesta de cGMP se observó después de 4 días de tratamiento diario. El tratamiento diario adicional dio como resultado una meseta de la respuesta de cGMP, hasta 8 días. Los resultados indican que el tratamiento diario de los ratones de tipo silvestre con 200 nmol/kg de Pro-CNP38 de hasta 8 días no desensibiliza la respuesta de cGMP.

5 La cinética de la respuesta de cGMP en el cartílago femoral distal después del tratamiento de los ratones de tipo silvestre con Pro-CNP38 también se investigó. El tratamiento de los ratones una vez al día durante dos días potenció la respuesta de cGMP a Pro-CNP38, en comparación con la respuesta de cGMP a un tratamiento individual (Figura 75B). Cuando los ratones se trataron el primer y tercer días, pero no el primer y segundo días, la respuesta de cGMP después del segundo tratamiento (en el tercer día) era sustancialmente similar a la respuesta de cGMP observada después de un solo tratamiento en el día uno (Figura 75B). Los resultados sugieren que la dosificación en días consecutivos es beneficiosa para la potenciación de la respuesta de cGMP a Pro-CNP38 en este estudio de ratón.

15 Activación de NPR-B en diferentes tejidos

Para evaluar la activación potencial de NPR-B en diferentes tejidos por una by a variante de CNP, los ratones CD-1 macho de tipo silvestre se inyectaron con 200 nmol/kg of Gly-CNP37, y la respuesta de cGMP se midió en ciertos tejidos en diferentes momentos. Para cada grupo de tratamiento se usaron dos ratones. Cada ratón recibió una inyección subcutánea de Gly-CNP37 o vehículo de control. Quince, 30 o 60 minutos o 3 horas después de la inyección, los ratones anestesiaron profundamente y se exanguinaron a través de toracotomía y canulación aórtica. La sangre circulante se retiró mediante un lavado abundante con PBS con una cánula aórtica. Se recogieron corazón, hígado, pulmón, riñón, pabellón auricular, aorta y cerebro. Todos los tejidos se hirvieron en agua durante 5 minutos, se diseccionaron finalmente (incluyendo el lavado abundante de la médula de las cortezas femorales con PBS), se pesaron, se enfriaron en nitrógeno líquido, y se pulverizaron en un BioPulverizer. Las muestras en polvo resultantes se homogeneizaron con un Polytron en ácido perclórico al 6 % enfriado previamente y se neutralizaron y con KOH al 60 %. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, y el sobrenadante se usó para el ensayo de cGMP (Kit de Inmunoensayo Enzimático de GMP Cíclico, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan). Los resultados se normalizaron para el peso del tejido.

30 La secreción de cGMP como respuesta al tratamiento con Gly-CNP37 ("CNP" en la Figura 76) era detectable en los fémures distales (hueso y cartílago), cortezas femorales (hueso), pabellón auricular (cartílago) y riñón (Figuras 76A-D). Las respuestas máximas de cGMP en esos tejidos se observaron 15 minutos después del tratamiento. El hígado, corazón, pulmón y tejidos cerebrales no mostraban una secreción de cGMP apreciable como respuesta a Gly-CNP37 con respecto al control de vehículo en los momentos estudiados (Figuras 76E-H). Los resultados indican que el tratamiento con 200 nmol/kg de Gly-CNP37 estimula la secreción de cGMP en cartílago, hueso y tejidos renales.

Ejemplo 16

40 Respuestas a la dosis de las variantes de CNP en monos

Los efectos de la variante de CNP, Pro-Gly-CNP37, en el crecimiento óseo y los niveles de biomarcadores relacionados con el crecimiento óseo se evalúan en monos cinomolgos. A ocho monos cinomolgos juveniles normales (aproximadamente 2,5 años de edad al inicio del estudio en desarrollo) se les inyecta diariamente 10 o 45 36 µg/kg/ día de Pro-Gly-CNP37 por vía subcutánea (n = 4 por grupo de dosis). A cuatro de estos monos se les administra vehículo como control. La duración total del tratamiento es de 6 meses. Diversas medidas de la expansión de la placa de crecimiento y el crecimiento óseo se realizan mediante formación de imágenes digitales por rayos X y por resonancia magnética y mediante medición de las longitudes de las extremidades y del cuerpo externamente. Periódicamente se recogen muestras de sangre y orina para patología clínica y la medición de los niveles de Pro-Gly-CNP37 y biomarcadores. Después de la terminación del estudio, se realiza la mayor parte de la patología y las muestras de tejido se evalúan histológicamente para la evaluación de la eficacia y la seguridad.

Los datos obtenidos hasta el momento en el estudio en desarrollo muestran que ambas dosis de Pro-Gly-CNP37 han aumentado el ancho de la placa de crecimiento por rayos X digitales (Figura 77), aumentaron las longitudes de la tibia derecha e izquierda mediante rayos X digitales (Figuras 78A y B), aumentaron la longitud de la pierna mediante medición externa (Figura 79), aumentaron la longitud del brazo mediante medición externa (Figura 80), aumentaron la longitud del cuerpo mediante medición externa (Figura 81), y aumentar el nivel en suero de la fosfatasa alcalina, un biomarcador para la formación ósea (Figura 82). Los datos demuestran que Pro-Gly-CNP37 puede estimular el crecimiento óseo en monos cinomolgos juveniles normales a dosis hemodinámicamente aceptables.

Ejemplo 17

Efectos de las variantes de CNP en el sistema cardiovascular en ratones

65

Se ha informado que los péptidos natriuréticos tales como CNP influyen en el sistema cardiovascular. Wang *et al.*, (Eur J Heart Fail. 9: 548-57, 2007) describen que se ha demostrado que el CNP tiene un efecto cardioprotector en la prevención de la isquemia del miocardio/lesión por reperfusión y mejoran la remodelación cardiaca después del infarto de miocardio en ratas. Wang demostró que los ratones que sobreexpresan CNP presentan una reducción de la incidencia de hipertrofia cardiaca causada por infarto de miocardio. Además, se ha demostrado que el CNP produce vasodilatación independiente del endotelio (M. Honing *et al.*, Hypertension, 37: 1179-1183 (2001)) y por lo tanto, puede disminuir de forma transitoria la presión sanguínea *in vivo*.

Para evaluar los efectos de las variantes de CNP en el sistema cardiovascular, se estudia la presión sanguínea y el ritmo cardiaco en ratones FVB de tipo silvestre anestesiados después de la inyección subcutánea de las variantes.

Después de un estudio piloto para definir una amplia gama de dosis de actividad cardiovascular, se realiza un estudio de respuesta a la dosis para examinar los efectos de tres niveles de dosis diferentes de cada variante de CNP. Tres ratones FVB macho de 8 semanas de edad comprenden cada grupo de tratamiento. Las dosis se administran por vía subcutánea a ratones anestesiados, y la presión arterial sistólica, diastólica y media (MAP), así como el ritmo cardiaco, se controlan a través de transductores de presión intraarterial implantados.

Ejemplo 18

Formulación de variantes de CNP

Se realizaron estudios de formulación previa de CNP para evaluar la estabilidad de la variante de CNP, Gly-wtCNP37 ("CNP38"), a diferentes pH (pH 3, 4, 5, 6, 7 y 8) y temperaturas (5 °C, 25 °C, y 40 °C) con el tiempo. El CNP38 presenta una estabilidad mayor a pH 4-6 que a los otros pH en los estudios. El CNP38 y la estabilidad 5 °C a pH 4-6, con \geq de aproximadamente un 95 % de CNP38 permaneciendo después de 15 semanas. Cuando la temperatura se elevaba a 25 °C, a pH 4, aproximadamente un 85 % de CNP38 permanecía después de 15 semanas, a pH 5 aproximadamente un 85 % permanecía después de 15 semanas, y a pH 6 aproximadamente un 80 % permanecía después de 15 semanas. Cuando la temperatura se elevaba a 40 °C, a pH 4 aproximadamente un 55-60 % de CNP38 permanecía después de 15 semanas, a pH 5 aproximadamente un 65 % permanecía después de 15 semanas, y a pH 6 aproximadamente un 40 % permanecía después de 15 semanas. La Figura 83 ilustra la representación observada de la constante de la tasa de degradación de pseudo-primer orden (K_{obs}) con respecto al pH de pH 3 a 8 y a 5 °C, 25 °C y 40 °C. Los datos de estabilidad para CNP38 en los estudios de formulación previa sugieren formulaciones de CNP que tienen un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. Un pH ácido (por ejemplo, pH \leq aproximadamente 6) puede estimular la estabilidad de una variante de CNP, por ejemplo, minimizando o evitando la desamidación de resto o restos de asparagina y/o glutamina, isomerización de resto o restos de ácido aspártico, o degradación de la variante de CNP mediante otras rutas.

Las variantes de CNP se pueden formular en vehículos farmacéuticos para su administración a sujetos afectados, por ejemplo, por afecciones de crecimiento óseo. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas de las variantes de CNP se formulan de acuerdo con cualquier combinación de los ingredientes y sus cantidades o concentraciones en la Tabla 16.

Tabla 16

Clase de Ingrediente	Ingrediente	Intervalo de Concentración
Principio activo	Variante de CNP	10 mg/ml \pm 9,9 mg/ml
Agente de tamponamiento	Ácido acético/acetato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente de tamponamiento	Ácido cítrico/citrato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente de ajuste de isotonicidad	NaCl	140 mM \pm 20 mM
Agente de ajuste de isotonicidad	Sacarosa	10 % \pm 5 %
Conservante	m-Cresol	0,4 % \pm 0,1 % o 0,2 %
Conservante/antiadsorbente	Alcohol bencílico	1,5 % \pm 0,5 %
Estabilizante	Glicerina (glicerol)	5 % - 100 % (puro) ¹
Estabilizante	Metionina	0,01 % - 0,2 %
Estabilizante	Sal de ácido ascórbico/ascorbato	0,1 % - 1 %
Estabilizante	Tioglicerol	0,1 % - 1 %
Antiadsorbente	Polisorbato 20	0,001 % - 0,5 %

Clase de Ingrediente	Ingrediente	Intervalo de Concentración
	Polisorbato 80	0,001 % - 0,5 %
	Alcohol bencílico	0,5 % - 1,5 %

¹La glicerina se usa para minimizar o para prevenir la hidrólisis dirigida en agua, desamidación, isomerización o escisión de las variantes de CNP. Para las formulaciones liofilizadas, un 4-6 % o un 6-20 % de manitol o sacarosa se puede sustituir por NaCl.

En ciertas realizaciones, las formulaciones liofilizadas de las variantes de CNP se preparan a partir de formulaciones formuladas de acuerdo con cualquiera de las combinaciones de los ingredientes y sus cantidades o concentraciones en la Tabla 17.

5

Tabla 17

Clase de Ingrediente	Ingrediente	Intervalo de Concentración
Principio activo	Variante de CNP	10 mg/ml \pm 9,9 mg/ml
Agente de tamponamiento	Ácido acético/acetato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente de tamponamiento	Ácido cítrico/citrato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente de ajuste de isotonicidad/ agente formador de volumen	Sorbitol	5 % \pm 3 %
Agente de ajuste de isotonicidad/ agente formador de volumen	Manitol	5 % \pm 3 %
Agente de ajuste de isotonicidad/ agente formador de volumen	Sacarosa	10 % \pm 5 %
Conservante	m-Cresol	0,4 % \pm 0,2 %
Conservante/antiadsorbente	Alcohol bencílico	1,5 % \pm 0,5 %
Estabilizante	Glicerina (glicerol)	5 % - 100 % (puro) ¹
Estabilizante	Metionina	0,01 % - 0,2 %
Estabilizante	Sal de ácido ascórbico/ascorbato	0,1 % - 1 %
Estabilizante	Tioglicerol	0,1 % - 1 %
Antiadsorbente	Polisorbato 20	0,001 % - 0,5 %
	Polisorbato 80	0,001 % - 0,5 %
	Alcohol bencílico	0,5 % - 1,5 %

¹La glicerina se usa para minimizar o para prevenir la hidrólisis dirigida en agua, desamidación, isomerización o escisión de las variantes de CNP.

En ciertas realizaciones, una formulación que comprende una variante de CNP tiene un pH de aproximadamente 3-7, o aproximadamente 3-6, o aproximadamente 3,5-6,5, o aproximadamente 4-6, o aproximadamente 4-5, o aproximadamente 4,5-4,4. En algunas realizaciones, para pH 4-4,5, un agente de tamponamiento adecuado es ácido acético/acetato (por ejemplo, acetato sódico), y para pH 4,5-6 un agente de tamponamiento adecuado es ácido cítrico/citrato. El ácido cítrico/citrato (por ejemplo, citrato sódico) también es un agente de tamponamiento adecuado en el intervalo de pH 3-6 o pH 4-6. En ciertas realizaciones, el agente de tamponamiento tiene una concentración en la formulación de aproximadamente 2-50 mM, o aproximadamente 2-40 mM, o aproximadamente 2-30 mM, o aproximadamente 5-30 mM, o aproximadamente 2-20 mM, o aproximadamente 5-20 mM, o aproximadamente 5-15 mM.

Para minimizar o evitar la desamidación de una variante de CNP, la variante se puede formular en cosolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, tales como glicerina, etanol, y propilenglicol. Dado que la desamidación se produce por hidrólisis, la sustitución de un cosolvente orgánico por agua minimiza el contacto de la variante de CNP con agua. La concentración de uno o más disolventes orgánicos en un sistema de disolvente orgánico-acuoso puede ser, por ejemplo, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 % si no se usa agua.

También para minimizar o evitar la desamidación de una variante de CNP, el agua se puede retirar de la formulación por la liofilización. En algunas realizaciones, las formulaciones liofilizadas contienen cualquier combinación de los siguientes componentes:

tampón: acetato sódico y ácido acético, o citrato sódico y ácido cítrico;
 agente de isotonicidad/formador de volumen: manitol (por ejemplo, 3-10 %, 2-8 % o 4-6 %); sacarosa (por ejemplo, 6-20 %, 5-15 % o 8-12 %);
 antioxidantes: metionina y/o ácido ascórbico con una proporción molar de cada antioxidante con respecto a variante de CNP de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 5:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 15:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, o de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1,

La desamidación también se puede minimizar o evitar por almacenamiento de una composición de CNP (por ejemplo, una formulación líquida o una formulación liofilizada) a temperatura más baja, tal como a aproximadamente 5 °C, 0 °C, -10 °C, -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, o -100 °C.

Para minimizar o evitar la oxidación de restos oxidables (por ejemplo, metionina) en una variante de CNP, la variante se puede formular con uno o más antioxidantes. Los antioxidantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, metionina, ácido ascórbico, y tioglicerol. La oxidación de, por ejemplo, restos de metionina también se puede minimizar o evitar purgando oxígeno de un medio líquido (si fuera una formulación líquida) con nitrógeno o argón, y/o purgando oxígeno de un recipiente o un envase con nitrógeno o argón.

En algunas realizaciones, para minimizar o evitar la adsorción (por ejemplo, adsorción de una variante de CNP a plástico o vidrio), se añade Polisorbato 20, Polisorbato 80 o Polisorbato, o una combinación de los mismos, a una formulación de CNP. En ciertas realizaciones, cada uno del o los antiadsorbente(s) está en una concentración de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 %, o de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,5 %, o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 %, o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %, o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1,5 %, o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 2 %, o de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 %. El intervalo o intervalos de antiadsorbente o antiadsorbentes a modo de ejemplo en la formulación incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 % de Polisorbato 20, de aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 % de Polisorbato 80, y/o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1,5 % de Polisorbato.

En ciertas realizaciones, una formulación de CNP líquida comprende, o una formulación de CNP liofilizada se prepara a partir de una formulación que comprende, (1) un tampón de ácido acético/acetato (por ejemplo, acetato sódico) que tiene una concentración de aproximadamente 30 mM \pm 5 o agente de tamponamiento 10 mM y un pH de aproximadamente 4 \pm 0,5 o 1, y (2) Polisorbato (por ejemplo, como un conservante y/o antiadsorbente) a una concentración de aproximadamente 1 % \pm 0,5 %, y opcionalmente (3) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % \pm 5 %.

Ejemplo 19

Evaluación clínica de las variantes de CNP

El siguiente ejemplo proporciona directrices en los parámetros a usar para la evaluación clínica de las composiciones que comprenden CNP22 o variantes del mismo en los métodos terapéuticos de la presente divulgación. Como se discute en el presente documento, el CNP22 o variantes del mismo se usarán en el tratamiento de trastornos sensibles a CNP, incluyendo trastornos de los huesos y del músculo liso vascular. Se realizarán ensayos clínicos que proporcionarán una evaluación de las dosis de CNP22 o variantes del mismo para seguridad, farmacocinética, y respuesta inicial de criterios de valoración clínicos tanto sustitutos como definidos. El ensayo se realizará durante un periodo mínimo, bu pero que no necesariamente se limita al mismo, de 24 semanas para recoger col la suficiente información de seguridad en aproximadamente 100 pacientes evaluables. La dosis inicial para los ensayos variará de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg/semana, o cualquiera de las dosis que se describen en el presente documento. En caso de que la dosis inicial en este intervalo no produzca un beneficio clínico directo significativo, la dosis se debería aumentar dentro de este intervalo o más allá de este intervalo si fuera necesario, y se debería mantener durante un periodo mínimo adicional de, pero no necesariamente limitado al mismo, 24 semanas para establecer seguridad y para evaluar adicionalmente la eficacia.

Las mediciones de seguridad incluirán sucesos adversos, reacciones alérgicas, panel completo de química clínica (incluyendo funciones renales y hepáticas), urinálisis, y CBC con diferencial. Además, se controlaran otros parámetros relevantes para el beneficio clínico. El presente ejemplo también incluye la determinación de parámetros farmacocinéticos de CNP22 o variantes del mismo, que incluyen absorción, distribución, metabolismo, excreción, y semivida y biodisponibilidad en la sangre. Se espera que tales análisis ayuden a relacionar la dosis con la respuesta clínica.

Métodos

Los pacientes se someterán a una historia médica de medida inicial y examen físico, y un conjunto patrón de ensayos clínicos de laboratorio (incluyendo CBC, Panel 20, CH50, y UA). A los pacientes se les seguirá de cerca

con sus visitas semanales a la clínica. Los pacientes volverán a la clínica para una evaluación completa una semana después de finalizar el periodo de tratamiento. Si fuera necesario un aumento de la dosis, los pacientes seguirán el mismo programa que se ha expuesto anteriormente. La seguridad se controlará durante todo el ensayo.

5 Diagnóstico y Criterios de Inclusión

Los pacientes pueden ser macho o hembra, con un diagnóstico documentado de un trastorno de un trastorno potencialmente sensible a CNP. Un ejemplo específico de un trastorno relacionado con los huesos, potencialmente sensible a CNP es la acondroplasia, que se puede confirmar por ensayo genético y otras evidencias de una mutación o disfunción de FGFR-3. El intervalo de edad ideal para de los pacientes con acondroplasia será de niño (< 1 año de edad) a preadolescente (< 13 años de edad). Una paciente se excluirá de este estudio si la paciente está embarazada o en periodo de lactancia; ha recibido un fármaco de investigación dentro de los 30 días antes de la inscripción en el estudio; o tiene una afección médica, enfermedad intercurrente grave, u otra circunstancia atenuante que pueda disminuir de forma significativa el cumplimiento del estudio.

15 Seguridad

Se determinará que la terapia con CNP22 o variantes del mismo es segura si no se produce ninguna reacción aguda o crónica significativa durante el transcurso del estudio. Se determinará que la administración a largo plazo del fármaco segura si no se observan anomalías significativas en los exámenes clínicos, laboratorios clínicos, u otros estudios apropiados.

Se ha mostrado que, en comparación con CNP22 de tipo silvestre, ciertas variantes de CNP de la divulgación son mucho más resistentes a la degradación de NEP *in vitro*, tienen una semivida y biodisponibilidad en ratas en plasma mucho más largas, estimulan un nivel mucho más elevado de producción de cGMP en ratas y/o induce un aumento significativamente más elevado en la longitud de huesos largos y la longitud corporal en ratones acondroplásicos. Además, se ha observado que los tratamientos de régimen de dosis de duración breve con CNP22 son casi tan eficaces como el tratamiento continuo con CNP22 para invertir la parada del crecimiento de condrocitos *in vitro* inducida por FGF2. Estos resultados, entre otros que se describen en el presente documento, demuestran la utilidad de las variantes de CNP de la divulgación para tratar afecciones o trastornos sensibles a CNP tales como, por ejemplo, trastornos relacionados con los huesos y trastornos del músculo liso vascular.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> BioMarin Pharmaceutical Inc. Wendt, et al.

<120> Variantes de péptido natriurético de tipo C

40 <130> 30610/44556P2

<160> 237

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

55 <223> CNP-22 ts

<220>

<221> DISULFURO

<222> (6)..(22)

60 <223> Las cisteínas en las posiciones 6 y 22 forman un dominio cíclico a través de un enlace disulfuro

<400> 1

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP-17

15 <400> 2

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 1 5 10 15

Cys

20 <210> 3
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP-27

30 <400> 3

Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

35 <210> 4
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP-53

45 <400> 4

ES 2 608 457 T3

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
20 25 30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
35 40 45

Ser Gly Leu Gly Cys
50

- 5 <210> 5
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Polipéptido Sintético
- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Gly está opcionalmente modificado con una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido natriurético, un polipéptido no natriurético
- 20 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (22)..(22)
- <223> Cys está opcionalmente modificado con una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido natriurético, un polipéptido no natriurético
- <400> 5

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

- 30 <210> 6
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
- <223> Polipéptido Sintético
- 40 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Gly está modificado con un grupo polimérico sintético o natural o una combinación de los mismos
- 45 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser
- 50 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10)..(10)
- <223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido o

ES 2 608 457 T3

peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con un grupo polimérico sintético o natural o una combinación de los mismos

10 <400> 6

Gly Leu Ser Xaa Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

15 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

25 <400> 7

Gly Ala Asn Lys Lys
 1 5

30 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40 <400> 8

Gly Ala Asn Arg Arg
 1 5

45 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

55 <400> 9

Gly Ala Asn Pro Arg
 1 5

60 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

ES 2 608 457 T3

	<400> 10				
				Gly Ala Asn Gln Gln	
				1	5
5	<210> 11				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
10	<220>				
	<223> Polipéptido Sintético				
	<400> 11				
				Gly Ala Asn Ser Ser	
15				1	5
	<210> 12				
	<211> 5				
	<212> PRT				
20	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
	<223> Polipéptido Sintético				
25	<400> 12				
				Gly Ala Asn Arg Gln	
				1	5
	<210> 13				
30	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
35	<223> Polipéptido Sintético				
	<400> 13				
				Gly Ala Asn Arg Met	
40				1	5
	<210> 14				
	<211> 5				
	<212> PRT				
45	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
	<223> Polipéptido Sintético				
	<400> 14				
50				Gly Ala Asn Arg Thr	
				1	5
	<210> 15				
55	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
60	<223> Polipéptido Sintético				
	<400> 15				

ES 2 608 457 T3

Gly Ala Asn Arg Ser
1 5

5 <210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 16

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala
1 5 10

15 <210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 17

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
1 5 10

25 <210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 18

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg
1 5 10

35 <210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 19

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

45 <210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 20

55

60

ES 2 608 457 T3

	Gln	Glu	His	Pro	Asn	Ala	Arg	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ala	Asn	Arg	Arg	
	1				5					10					15	
5	<210> 21 <211> 31 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
10	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 21															
	Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Arg	Ala	Ala	Trp	Ala	Arg	Leu	Leu
	1				5					10					15	
15	<210> 22 <211> 31 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
20	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 22															
	Gln	Glu	His	Pro	Asn	Ala	Arg	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ala	Asn	Lys	Lys	
				20					25					30		
15	<210> 22 <211> 31 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
20	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 22															
	Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Arg	Ala	Ala	Trp	Ala	Arg	Leu	Leu
	1				5					10					15	
25	<210> 23 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
30	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 23															
35	<210> 23 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
40	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 23															
40	<210> 24 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
45	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 24															
50	<210> 24 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia Artificial															
55	<220> <223> Polipéptido Sintético <400> 24															
50	<210> 25 <211> 9 <212> PRT															

ES 2 608 457 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 5
 <400> 25

 Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
 1 5

 10
 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 26

 Met Val Gln Gly Ser Gly
 1 5

 20

 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 25
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 30
 <400> 27

 Lys Val Leu Arg Arg Tyr
 1 5

 35
 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 28

 Lys Val Leu Arg Arg His
 1 5

 45
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 29
 55
 Gly Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
 1 5 10

 <210> 30
 <211> 9
 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 30
 5
 Gly Val Pro Gln Val Ser Thr Ser Thr
 1 5

 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 15
 <400> 31

 Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
 1 5 10 15

 20 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 32

 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 1 5 10

 30 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Prolongación de aminoácido

 <400> 33

 Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
 1 5 10 15

 50 <210> 34
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP-22 con prolongación de aminoácido

 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)

ES 2 608 457 T3

<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Cys está opcionalmente modificado con un grupo polimérico sintético, natural o combinado

15 <400> 34

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
1 5 10 15

Leu Ser Xaa Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 35

20 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CNP22 (K4R)

30 <400> 35

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 36

35 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

45 <223> GANRR-CNP22(K4R) - CNP27(Arg4)

<400> 36

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

ES 2 608 457 T3

<210> 37
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANPR-CNP22(K4R) - CNP27(Pro4) - Análogo CI
 <400> 37
 Gly Ala Asn Pro Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 15 20 25
 <210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> ER-CNP22
 <400> 38
 30 Glu Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 <210> 39
 <211> 24
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BA - ER-CNP22(K4R)
 <400> 39
 45 Glu Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 <210> 40
 50 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> R-CNP22

<400> 40

Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

10 <210> 41
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AZ - R-CNP22(K4R)

<400> 41

25 Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

30 <210> 42
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP22 (K4R)(K10R)

<400> 42

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

45 <210> 43
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <223> CNP-22 (enlace variable Cys6-Phe7)

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH2-NH-

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -C(=O)-N(R)- donde R es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo.

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -C(=O)-NH-CH2-

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH2-S-

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH2-S(O)n donde n es 1 o 2

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH2-CH2-

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH=CH-

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -C(=O)-CH2-

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH(CN)-NH-

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -CH(OH)-CH2-

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con -O-C(=O)-NH-

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Enlace peptídico Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) reemplazado con NHC(=O)NH-

65 <400> 43

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 44
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es ácido 3-amino-2-fenilpropiónico o D-Phe

<400> 44

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 45
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNP22 - Cys6 modificado

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Cys, homocisteína, penicilamina, ácido 2-mercaptopropiónico, o ácido 3-mercaptopropiónico.

<400> 45

Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

40 <210> 46
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Gly está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al cartílago óseo, un bifosfonato,

poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, polímeros, PEG, carbohidratos, ácidos hidrófobos, o aminoácidos

- 5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser, o Glu
- 10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> Xaa es Cys con isoésteres de enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7
- 15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es L-Phe, D-Phe, ácido 3-amino-2-fenilpropiónico, o derivados de Phe N-alquilados
- 20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es Gly, terc-butyl-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val o Asn
- 25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Leu, Ser, Thr o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
- 30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu
- 35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Xaa es Leu o isoésteres de enlace peptídico del mismo
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es Ile, tBu-Gly e isoésteres de enlace peptídico de los mismos
- 45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Xaa es Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) o ácido 2-amino-isobutírico (Aib)
- 50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Xaa es Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg o o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
- 55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Cys está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al cartílago óseo, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, o secuencias de aminoácidos derivadas de polipéptidos no CNP
- 60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Cys está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al cartílago óseo, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, o secuencias de aminoácidos derivadas de polipéptidos no CNP
- 65 <400> 46

ES 2 608 457 T3

- <222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -CH₂-CH₂-
- 5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -CH=CH-
- 10
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -C(=O)-CH₂-
- 15
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -CH(CN)-NH-
- 20
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -CH(OH)-CH₂-
- 25
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -O-C(=O)-NH-
- 30
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> El enlace peptídico entre las posiciones 6 y 7 puede reemplazarse con -NHC(=O)NH-
- 35
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es L-Phe, D-Phe, ácido 3-amino-2-fenilpropiónico, o derivados de Phe N-alkilados
- 40
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es Gly, terc-butil-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr o Asn
- 45
<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Leu, Ser, Thr o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
- 50
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu
- 55
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Xaa es Leu o isoésteres peptídicos del mismo
- 60
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Xaa es Ile, tBu-Gly o o isoésteres peptídicos del mismo
- 65
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)

<223> Xaa es Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) o ácido 2-amino-isobutírico (Aib)

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, Arg o isoésteres de enlace peptídico de los mismos

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con un compuesto sintético que se dirige al hueso, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, o moléculas de PEG cargadas

15 <400> 47

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Gly Ser
 1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys
 20

<210> 48
 20 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 30 <223> Xaa es un grupo polimérico sintético o natural o una combinación de los mismos

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa está ausente o puede ser uno o más aminoácidos entre Gly-Leu-Ser-Lys-Gly y/o sustituciones en una o más de estas posiciones

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 40 <223> Xaa es Lys, una sustitución conservativa de aminoácidos, cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 45 <223> Cys está opcionalmente modificado con un grupo polimérico sintético o natural o una combinación de los mismos

50 <400> 48

Xaa Xaa Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
 1 5 10 15

Leu Gly Cys

<210> 49
 55 <211> 18
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa está ausente o puede ser un fragmento peptídico o un polímero hidrosoluble
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Cys o isoésteres de enlace peptídico del mismo
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es L-Phe, D-Phe, ácido 3-amino-2-fenilpropiónico o derivados N-alkilados de Phe
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es Gly, terc-butyl-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr o Asn
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Leu, Ser, Thr o N-Me-Leu
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Leu o isoésteres de enlace peptídico del mismo
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Ile, tBu-Gly o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) o ácido 2-amino-isobutírico (Aib)
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg o o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
 55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con secuencias de aminoácidos útiles en el direccionamiento al hueso/cartilago, poliAsp o poliGlu, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína o secuencias derivadas de NPPC o polipéptidos no CNP
 60
 <400> 49
 65

ES 2 608 457 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Met, Val, Asn, beta-CI-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) o ácido 2-amino-isobutírico (Aib)

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser o o isoésteres de enlace peptídico de los mismos

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al hueso, restos que reducen la eliminación renal, moléculas de PEG cargadas o polímeros hidrófilos

15

<400> 50

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Xaa Ser
 1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys
 20

20

<210> 51
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Arg o Glu

35

<400> 51

Xaa Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

40

<210> 52
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Arg, Gln o Ser

50

<400> 52

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Xaa Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 53
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Ser, Asn, Arg, o Cit

<400> 53

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Xaa Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 54
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Ser, Arg, o Asn

<400> 54

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Xaa Leu Gly Cys
 20

35 <210> 55
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Ser, Thr, o Arg

50 <400> 55

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Xaa Cys
 20

5 <210> 56
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo A

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (6)..(6)
 <223> CH₂NH

20 <400> 56

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

25 <210> 57
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogos B

35 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa reemplazado con N-Me-Phe

40 <400> 57

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

45 <210> 58
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo F

5

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (8)..(8)
 <223> tBu

10

<400> 58

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

<210> 59
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo H

25

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa está reemplazado con NHCH2-CH(Phe)CO

30

<400> 59

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

35

<210> 60
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BL - CNP37

45

<400> 60

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
 35

ES 2 608 457 T3

<210> 61
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CA
 <400> 61
 Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Gly Leu Ser
 1 5 10 15
 Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
 20 25 30
 Leu Gly Cys
 15 35
 <210> 62
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CB
 30
 <400> 62
 Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Cys
 35 35
 35
 <210> 63
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CC
 45
 <400> 63

ES 2 608 457 T3

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Cys
 35

5 <210> 64
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANQQ-CNP22

15 <400> 64

Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

20 <210> 65
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANRR-CNP22

30 <400> 65

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

35 <210> 66
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANPR-CNP22

45 <400> 66

ES 2 608 457 T3

Gly Ala Asn Pro Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

5 <210> 67
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANSS-CNP22

15 <400> 67

Gly Ala Asn Ser Ser Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

20 <210> 68
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CD

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Extremo N-terminal de la cola de BNP

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Extremo N-terminal de la cola de BNP

<400> 68

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp
 1 5 10 15

Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

45 <210> 69
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

ES 2 608 457 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANQQ-CNP22(K4R) - Análogo CH

5 <400> 69

Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

10 <210> 70
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GANSS-CNP22(K4R) - Análogo CG

<400> 70

Gly Ala Asn Ser Ser Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

25 <210> 71
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CS

<400> 71

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Pro Lys
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

40 <210> 72
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>

ES 2 608 457 T3

<221> MISC_FEATURE

<223> Análogo CT

<400> 72

5

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Gln Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 73

<211> 38

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Análogo CU

20

<400> 73

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Gln Gln
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 74

25

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Polipéptido Sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Análogo CW

35

<400> 74

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Pro
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

40

<210> 75

<211> 38

ES 2 608 457 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 75

 Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 20 25 30

 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

 <210> 76
 <211> 37
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 20

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CQ
 25

 <400> 76

 Gly His His Ser His Glu Gln His Pro His Gly Ala Asn Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 20 25 30

 Ser Gly Leu Gly Cys
 35

 <210> 77
 <211> 38
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 35

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CR
 40

 <400> 77

 Gly Ala His His Pro His Glu His Asp Thr His Gly Ala Asn Gln Gln
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 20 25 30

 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

<210> 78
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CX
 <400> 78
 Gly His His Ser His Glu Gln His Pro His Gly Ala Asn Pro Arg Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 20 25 30
 Ser Gly Leu Gly Cys
 35
 15
 <210> 79
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CF
 <400> 79
 30
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Cys
 35
 35
 <210> 80
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CY
 45
 <400> 80

ES 2 608 457 T3

Gly Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Gly Ala Asn Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

5 <210> 81
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CE

15 <400> 81

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Gly
 1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
 35

20 <210> 82
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CZ

<400> 82

Phe Gly Ile Pro Met Asp Arg Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
 20 25 30

Leu Gly Cys
 35

40 <210> 83
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

ES 2 608 457 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo DA

5 <400> 83

Gly Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly
 1 5 10 15

Pro Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
 20 25 30

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40

10 <210> 84
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CK

<400> 84

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Gly Ala Asn Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
 35

25 <210> 85
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CL

<400> 85

Gly Val Pro Gln Val Ser Thr Ser Thr Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
 20 25 30

Gly Leu Gly Cys
 35

40 <210> 86

<211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CM

<400> 86

	Gly	Gln	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ser	Thr	Gly	Ala	Asn	Gln	Gln	Gly
	1				5					10					15	
	Leu	Ser	Arg	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Met
			20						25					30		
	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys											
			35													

15

<210> 87
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CN

<400> 87

	Gly	Gln	Thr	His	Ser	Ser	Gly	Thr	Gln	Ser	Gly	Ala	Asn	Gln	Gln	Gly
	1				5					10					15	
	Leu	Ser	Arg	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Met
			20						25					30		
	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys											
			35													

30

<210> 88
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CO

45

<400> 88

ES 2 608 457 T3

Gly Ser Thr Gly Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ala Asn Gln Gln Gly
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
35

5 <210> 89
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo CP

15 <400> 89

Gly Ser Gly Ala Asn Gln Gln Gly
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
35

20 <210> 90
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido Sintético

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gly está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al hueso, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, moléculas de PEG cargadas negativamente o polímeros naturales

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es Cys u otro aminoácido natural o no natural

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Phe u otro aminoácido natural o no natural

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es Gly, un aminoácido natural o no natural mayor o un peptidomimético

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con un compuesto que se dirige al hueso, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, osteocalcina o sialoproteína, moléculas de PEG cargadas negativamente o polímeros naturales
 5
 <400> 90
 Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Xaa Xaa Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 10
 <210> 91
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo J
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es CH2-NH
 30
 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(9)
 <223> N-Me
 35
 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (20)..(20)
 <223> N-Me
 <400> 91
 Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 40
 <210> 92
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo K
 55
 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(9)
 <223> N-Me

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (20)..(20)
 <223> N-Me
 5
 <400> 92

 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 10
 <210> 93
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20
 <223> Análogo L

 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(9)
 25
 <223> N-Me

 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (11)..(11)
 30
 <223> N-Me

 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (20)..(20)
 35
 <223> N-Me

 <400> 93

 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 40
 <210> 94
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50
 <223> Análogo M

 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(9)
 55
 <223> N-Me

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (11)..(11)
 <223> N-Me
 5
 <400> 94
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 10
 <210> 95
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo Z
 20
 <400> 95
 Gly Leu Ser Arg Gly Cys Tyr Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 25
 <210> 96
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AA
 35
 <400> 96
 Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Val Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 40
 <210> 97
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AB
 50

ES 2 608 457 T3

<400> 97

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Ser Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

5 <210> 98
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AC

<400> 98

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Thr Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

20 <210> 99
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido Sintético

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AD

<400> 99

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Thr Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

35 <210> 100
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Polipéptido Sintético

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AE

<400> 100

50 Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Arg Ser
1 5 10 15

ES 2 608 457 T3

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

5 <210> 101
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AF

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Xaa es Cit

20 <400> 101

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Xaa Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

25 <210> 102
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AG

35 <400> 102

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Leu Gly Cys
20

40 <210> 103
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo AJ

50 <400> 103

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Val Gly Cys
 20

5 <210> 104
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AK

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es tBu-A1a

20 <400> 104

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Xaa Gly Cys
 20

25 <210> 105
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AT

35 <400> 105

Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

40 <210> 106
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AV

<220>

ES 2 608 457 T3

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Extremo N-terminal modificado con ácido pentanoico
 5 <400> 106
 Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 <210> 107
 10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo AW
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ácido heptanoico que modifica el extremo N-terminal
 25 <400> 107
 Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 30 <210> 108
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <223> Análogo BB
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Extremo N-terminal modificado con ácido heptanoico
 <400> 108
 Glu Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 50 <210> 109
 <211> 22

ES 2 608 457 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BC

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Extremo N-terminal modificado con ácido pentanoico

<400> 109

Glu Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 110
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BF

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Cit

<400> 110

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

40 <210> 111
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BG

<400> 111

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Gln Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 112
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BH

15 <400> 112

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 113
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BJ

30 <400> 113

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Asn Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

35 <210> 114
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BK

45 <400> 114

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Ser Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 115
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo N

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(22)
 <223> Todos los D-aminoácidos

20 <400> 115

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

25 <210> 116
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BD

35 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(9)
 <223> N-Me

40 <400> 116

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

45 <210> 117
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BN

5

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (11)..(11)
 <223> N-Me

10

<400> 117

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

15

<210> 118
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BE

30

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (20)..(20)
 <223> N-Me

<400> 118

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

35

<210> 119
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo V

50

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (7)..(7)
 <223> 3,4-dicloro

<400> 119

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 120
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo X

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (7)..(7)
 <223> 3-metilo

20 <400> 120

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

25 <210> 121
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BP

35 <400> 121

Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

40 <210> 122
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BO

50 <400> 122

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Arg Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 123
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo P

<400> 123

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 124
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BY

<400> 124

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Ser Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

35 <210> 125
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BZ

<400> 125

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Gln
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

5 <210> 126
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BX

15 <400> 126

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20 <210> 127
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BQ

30 <400> 127

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Gly Cys
 20

35 <210> 128
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BR

45 <400> 128

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Arg Leu Gly Cys
 20

5 <210> 129
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BS

15 <400> 129

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Arg Gly Cys
 20

20 <210> 130
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BT

30 <400> 130

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Ser Cys
 20

35 <210> 131
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BU

45 <400> 131

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Thr Cys
 20

5 <210> 132
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo BW

15 <400> 132

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Arg Cys
 20

20 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo CJ

<400> 133

Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Cys
 1 5 10 15

35 <210> 134
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Extremo N-terminal unido a CNP22 mediante glutarato de disuccinimidilo

<400> 134

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

50 Met Ser Gly Leu Gly Cys

<210> 135
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Extremo N-terminal unido a CNP22 mediante Bis-PEO5
 <400> 135
 15
 Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 <210> 136
 <211> 22
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo E
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es D-Phe
 35
 <400> 136
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 <210> 137
 <211> 22
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo G
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es 3-Cl-Phe
 55
 <400> 137

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

- 5 <210> 138
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Polipéptido Sintético
- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa comprende uno o más aminoácidos seleccionados entre Gly-Leu-Ser-Lys-Gly o sustituciones en uno o más de estos aminoácidos y comprende además un polímero hidrófilo o hidrosoluble
- <400> 138

Xaa Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Gly Cys

- 20 <210> 139
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
- <223> Polipéptido Sintético
- 30 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Cys está modificado con un polímero natural y/o sintético
- 35 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (17)..(17)
- <223> Cys está modificado con un polímero natural y/o sintético
- 40 <400> 139

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 1 5 10 15

Cys

- 45 <210> 140
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
- <223> Polipéptido Sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Gly está modificado con un polímero natural y/o sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está modificado con un polímero natural y/o sintético
 5
 <400> 140

 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15

 Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20
 10
 <210> 141
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (1)..(1)
 <223> Cys está modificado con un grupo polimérico natural y/o sintético o una combinación de los mismos

 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu o Ser
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con un grupo polimérico natural y/o sintético o una combinación de los mismos
 35
 <400> 141

 Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
 1 5 10 15

 Cys
 40
 <210> 142
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa está opcionalmente modificado con restos que se dirigen al hueso o al cartílago, restos que reducen la eliminación renal, polímeros hidrófilos, carbohidratos, ácidos hidrófobos y combinaciones de los mismos

 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa está ausente o puede contener 1 a 5 aminoácidos entre Gly-Leu-Ser-Lys-Gly, opcionalmente sustituidos con un aminoácido natural o no natural

- 5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Lys, cualquier aminoácido o peptidomimético natural o no natural que no tenga una amina primaria reactiva en una cadena lateral
- 10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Xaa está opcionalmente modificado con restos que se dirigen al hueso o al cartílago, restos que reducen la eliminación renal, polímeros hidrófilos, carbohidratos, ácidos hidrófobos y combinaciones de los mismos
- <400> 142
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Cys | Phe | Gly | Leu | Xaa | Leu | Asp | Arg | Ile | Gly | Ser | Met | Ser | Gly |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- 15 Leu Gly Cys
- 20 <210> 143
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gly está opcionalmente modificado con compuestos que se dirigen al cartílago o al hueso, un bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, péptidos de osteocalcina, péptidos de sialoproteína, moléculas de PEG cargadas o polímeros hidrófilos
- 30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu
- 35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es Cys o isoésteres peptídicos entre las posiciones 6 y 7
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es L-Phe, D-Phe, Phe N-alkilado, o análogo de Phe
- 45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es Gly, terc-butil-Gly, Thr, Ser, Val o Asn
- 50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Leu, Ser, Thr o o isoésteres de enlace peptídico de los mismos
- 55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu
- 60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Lys o una sustitución de aminoácidos conservativa del mismo, cualquier aminoácido natural o no natural, Arg, Gly, 6-hidroxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser o Glu

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Gly, Arg, Ser o Asn
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butyl-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser o o
 25
 isoésteres de enlace peptídico de los mismos

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Cys está opcionalmente modificado con compuestos que se dirigen al cartílago o al hueso, un
 30
 bisfosfonato, poliAsp, poliGlu, péptidos de osteopontina, péptidos de osteocalcina, péptidos de sialoproteína,
 moléculas de PEG cargadas o polímeros hidrófilos

<400> 143
 35

Gly	Leu	Ser	Xaa	Gly	Xaa	Asp	Arg	Xaa	Xaa	Ser						
1				5						10					15	

Xaa	Ser	Gly	Xaa	Gly	Cys
				20	

<210> 144
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40

<220>
 <223> Polipéptido Sintético
 45

<400> 144

Gly	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Lys	Lys
1				5					10					15	

Gly	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser
			20					25					30		

Met	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys
				35	

<210> 145
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50

ES 2 608 457 T3

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 145

5

```

Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1          5          10          15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20          25          30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35
    
```

10 <210> 146
<211> 52
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 146

```

Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln
1          5          10          15

Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu
20          25          30

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
35          40          45

Gly Leu Gly Cys
50
    
```

20 <210> 147
<211> 51
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 147

30

```

Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu
1          5          10          15

His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser
20          25          30

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
35          40          45

Leu Gly Cys
50
    
```

35 <210> 148
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 148

5

Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His
1 5 10 15

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys
20 25 30

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
35 40 45

Gly Cys
50

<210> 149
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Polipéptido Sintético

15

<400> 149

Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro
1 5 10 15

Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly
20 25 30

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
35 40 45

Cys

20

<210> 150
<211> 48
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 150

Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn
1 5 10 15

Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys
20 25 30

Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40 45

30

<210> 151
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 151
 5
 Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala
 1 5 10 15
 Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe
 20 25 30
 Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40 45
 <210> 152
 <211> 46
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 15 <400> 152
 Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
 20 25 30
 Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40 45
 20 <210> 153
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 153
 Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys
 1 5 10 15
 Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu
 20 25 30
 Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40 45
 30 <210> 154
 <211> 44
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 40 <400> 154

ES 2 608 457 T3

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr
1 5 10 15

Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys
20 25 30

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 155

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 155

Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
20 25 30

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 156

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 156

Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly
1 5 10 15

Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp
20 25 30

Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 157

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 157

ES 2 608 457 T3

Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala
1 5 10 15

Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg
20 25 30

Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 158
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 158

Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn
1 5 10 15

Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
20 25 30

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 159
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 159

Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 160
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 160

ES 2 608 457 T3

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

5 <210> 161
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 161

Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu
1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Cys
35

15 <210> 162
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 162

His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser
1 5 10 15

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
20 25 30

Leu Gly Cys
35

30 <210> 163
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 163

ES 2 608 457 T3

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys
1 5 10 15

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
20 25 30

Gly Cys

5 <210> 164
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 164

Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly
1 5 10 15

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
20 25 30

Cys

15 <210> 165
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido Sintético
<400> 165

Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys
1 5 10 15

25 Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25 30

30 <210> 166
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético
35 <400> 166

Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe
1 5 10 15

Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25 30

40 <210> 167
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 171

5
 Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp
 1 5 10 15
 Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

<210> 172
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

15
 <400> 172

Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg
 1 5 10 15
 Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

20
 <210> 173
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 173

Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

30
 <210> 174
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40
 <400> 174

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

45
 <210> 175
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 175

5
 Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
 1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Cys
 20

<210> 176
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

15
 <400> 176

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Cys
 20

<210> 177
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30
 <400> 177

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
 1 5 10 15

Leu Gly Cys

<210> 178
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40
 <400> 178

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Gly Cys

45
 <210> 179
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

ES 2 608 457 T3

<400> 179

Gly Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
50

5 <210> 180

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 180

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
20 25 30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Asn
35 40 45

Ser Gly Leu Gly Cys
50

15 <210> 181

<211> 38

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

25 <400> 181

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Ser Gly Leu Gly Cys
35

30 <210> 182

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 608 457 T3

<223> Polipéptido Sintético

<400> 182

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
1 5 10 15

5 Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 183

10 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Polipéptido Sintético

<400> 183

Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Ser Gly Leu Gly Cys
35

20

<210> 184

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 184

30

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Asn Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

<210> 185

<211> 54

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Polipéptido Sintético

<400> 185

ES 2 608 457 T3

Pro Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
50

5 <210> 186
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 186

Pro Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

15 <210> 187
<211> 34
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

25 <400> 187

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys
1 5 10 15

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
20 25 30

Gly Cys

30 <210> 188
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Polipéptido Sintético

<400> 188

ES 2 608 457 T3

Pro Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

5 <210> 189
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 189

Pro Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys
 1 5 10 15

15 Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20 25

<210> 190
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 190

Met Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
 20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 50

30 <210> 191
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 191

ES 2 608 457 T3

Met Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

5 <210> 192
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 192

Met Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

15 <210> 193
<211> 39
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

25 <400> 193

Met Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

30 <210> 194
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Polipéptido Sintético

<400> 194

Met Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys
1 5 10 15

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

40

ES 2 608 457 T3

<210> 195
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 195
 10
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Thr Gly Asp Asp Asp Asp Lys His Met Asp
 20 25 30
 <210> 196
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 20
 <400> 196
 Met Val Leu Thr Lys Lys Lys Leu Gln Asp Leu Val Arg Glu Val Cys
 1 5 10 15
 Pro Asn Glu Gln Leu Asp Glu Asp Val Glu Glu Met Leu Leu Gln Ile
 20 25 30
 Ala Asp Asp Phe Ile Glu Ser Val Val Thr Ala Ala Cys Gln Leu Ala
 35 40 45
 Arg His Arg Lys Ser Ser Thr Leu Glu Val Lys Asp Val Gln Leu His
 50 55 60
 Leu Glu Arg Gln Trp Asn Met Trp Ile Met Gly Ser Ser His His His
 65 70 75 80
 His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Thr Gly Asp
 85 90 95
 Asp Asp Asp Lys His Met Asp Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
 100 105 110
 Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
 115 120 125
 Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
 130 135 140
 25
 <210> 197
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

ES 2 608 457 T3

<400> 197

Val Leu Thr Lys Lys Lys Leu Gln Asp Leu Val Arg Glu Val Cys Pro
1 5 10 15

Asn Glu Gln Leu Asp Glu Asp Val Glu Glu Met Leu Leu Gln Ile Ala
20 25 30

Asp Asp Phe Ile Glu Ser Val Val Thr Ala Ala Cys Gln Leu Ala Arg
35 40 45

His Arg Lys Ser Ser Thr Leu Glu Val Lys Asp Val Gln Leu His Leu
50 55 60

Glu Arg Gln Trp Asn Met Trp Ile
65 70

5 <210> 198
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 198

15 Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
1 5

<210> 199
<211> 30
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

25 <400> 199

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
1 5 10 15

Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25 30

30 <210> 200
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 200

40 Gly Ala Asn Lys Pro
1 5

<210> 201
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 608 457 T3

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

5 <400> 201

Gly Ala Asn Pro Lys
 1 5

10 <210> 202
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 202

Gly Ala Asn Pro Gln
 1 5

20 <210> 203
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 203

Gly Ala Asn Gln Lys
 1 5

35 <210> 204
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Triakis scyllium

<400> 204

Arg Leu Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg
 20 25 30

40 Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40

45 <210> 205
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Triakis scyllium

<400> 205

ES 2 608 457 T3

Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg Ser Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly
 20 25 30

Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

5
 <210> 206
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Triakis scyllium

<400> 206

Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg Ser Lys Lys
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
 20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

10
 <210> 207
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Triakis scyllium

<400> 207

Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
 1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 20

20
 <210> 208
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Lamna ditropis

<400> 208

Arg Leu Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg
 20 25 30

Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35 40

30
 <210> 209
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Lamna ditropis

<400> 209

35

ES 2 608 457 T3

Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg Ser Lys
1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

5
<210> 210
<211> 38
<212> PRT
<213> Lamna ditropis

<400> 210

Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg Ser Lys Lys
1 5 10 15

Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
20 25 30

10
Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

15
<210> 211
<211> 29
<212> PRT
<213> Lamna ditropis

<400> 211

20
Phe Lys Gly Arg Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val
1 5 10 15

Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

25
<210> 212
<211> 22
<212> PRT
<213> Lamna ditropis

<400> 212

Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

30
Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

35
<210> 213
<211> 41
<212> PRT
<213> Squalus acanthias

<400> 213

ES 2 608 457 T3

Arg Leu Leu Gln Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg
1 5 10 15

Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg
20 25 30

Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

5
<210> 214
<211> 22
<212> PRT
<213> Squalus acanthias

<400> 214

Gly Pro Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

10
Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

15
<210> 215
<211> 22
<212> PRT
<213> Oryzias latipes

<400> 215

Gly Trp Asn Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

20
Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

25
<210> 216
<211> 24
<212> PRT
<213> Oryzias latipes

<400> 216

Pro Met Val Ala Gly Gly Gly Cys Phe Gly Met Lys Met Asp Arg Ile
1 5 10 15

30
Gly Ser Ile Ser Gly Leu Gly Cys
20

35
<210> 217
<211> 27
<212> PRT
<213> Arothron maculatus

<400> 217

Gly Arg Ser Ser Met Val Gly Gly Arg Gly Cys Phe Gly Met Lys Ile
1 5 10 15

40
Asp Arg Ile Gly Ser Ile Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

<210> 218
<211> 22

ES 2 608 457 T3

Leu Leu His Asp His Pro Asn Pro Arg Lys Tyr Lys Pro Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Thr Ser Gly Leu Gly Cys
35

5
<210> 223
<211> 22
<212> PRT
<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 223

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

10
Thr Ser Gly Leu Gly Cys
20

15
<210> 224
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 224

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

25
<210> 225
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 225

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ser Gly Leu Gly Cys
20

35
<210> 226
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40
<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 226

ES 2 608 457 T3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Gly Cys
20

5 <210> 227
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 227

15 Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

20 <210> 228
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 228

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20 25

30 <210> 229
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 229

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15

40 Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20

45 <210> 230
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <400> 230

 Ile Glu Gly Arg Xaa
 1 5

 <210> 231
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 20
 <400> 231

 Asp Asp Asp Asp Lys Xaa
 1 5

 <210> 232
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 232

 Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Gly
 1 5

 <210> 233
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <400> 233

 Val Asp Asp Arg
 1

 <210> 234
 <211> 4

ES 2 608 457 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 234

10 Gly Ser Asp Arg
1

<210> 235
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

20 <400> 235

Ile Thr Asp Arg
1

25 <210> 236
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 236

35 Pro Gly Asp Arg
1

<210> 237
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 237

45 Ala Phe Leu Gly Pro Gly Asp Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una variante de péptido natriurético de tipo C (CNP) seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145);
 PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQMSGLGC (Pro-CNP37) (SEQ ID NO: 186);
 MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQMSGLGC (Met-CNP37) (SEQ ID NO: 192);
 MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 191).

10 2. Una composición farmacéutica que comprende una variante de CNP de la reivindicación 1, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que es una formulación liofilizada preparada a partir de una formulación que comprende un tampón de ácido cítrico/citrato o un tampón de ácido acético/acetato que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, en la que la formulación además comprende opcionalmente un agente de ajuste de isotonicidad y/o un agente formador de volumen, y/o además comprende un antioxidante seleccionado entre el grupo que consiste en metionina, ácido ascórbico, formas de sal de ácido ascórbico, tioglicerol, y combinaciones de los mismos.

20 4. Una variante de CNP de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 2 o 3 para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con los huesos o displasia esquelética seleccionado entre el grupo que consiste en artrosis, raquitismo hipofosfatémico, acondroplasia, hipoacondroplasia, estatura baja, enanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatófórica, osteogénesis imperfecta, acondrogénesis, acondroplasia homocigótica, condrodisplasia punctata, displasia camptomélica, hipofosfatasa letal congénita, tipo letal perinatal de osteogénesis imperfecta, síndromes de polidactilia y costillas cortas, hipoacondroplasia, tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, displasia metafisaria de tipo Jansen, displasia espondiloepifisaria congénita, atelosteogénesis, displasia diastrófica, displasia mesomélica de tipo Langer de fémur corto congénita, displasia mesomélica de 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.

35 5. Una variante de CNP de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno del músculo liso vascular seleccionado entre el grupo que consiste en hipertensión, reestenosis, arteriosclerosis, insuficiencia cardiaca descompensada aguda, insuficiencia cardiaca congestiva, edema cardiaco, nefredema, edema hepático, insuficiencia renal aguda e insuficiencia renal crónica.

40 6. Un método para producción recombinante de una variante de CNP de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

- 45 (i) cultivar una célula hospedadora bacteriana que comprende un primer polinucleótido que codifica una variante de polipéptido CNP de la reivindicación 1 unido a un segundo polinucleótido que codifica un péptido o proteína escindible en condiciones que dan como resultado la expresión de un polipéptido de fusión codificado por dicho primer y segundo polinucleótidos, en el que el polipéptido de fusión comprende dicha variante de CNP unida directamente a dicho péptido o proteína escindible o unida indirectamente al mismo a través de un conector y en el que el péptido o proteína escindible se selecciona entre el grupo que consiste en etiquetas de histidina, factor de transcripción humano TAF12, dominio de plegamiento de histona TAF12, TAF12(C/A), TAF12(D/E), TAF12(4D/4E), TAF12(6D/6E), TAF12(10D/10E), TAF12(C/A y D/E), TAF12(C/A y 4D/4E), TAF12(C/A y 6D/6E), TAF12(C/A y 10D/10E), cetosterioide isomerasa, proteína de unión a maltosa, β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, dominio de unión a quitina, BMP-2, y BMP-2(C/A), y
- 50 (ii) escindir dicho péptido o proteína escindible de dicho polipéptido de fusión para liberar dicha variante de CNP.

55 7. El método de la reivindicación 6, en el que el polipéptido de fusión se expresa como una proteína soluble o como un cuerpo de inclusión, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido de fusión expresado de la célula hospedadora o medio de cultivo.

60 8. El método de la reivindicación 6 o 7, que comprende adicionalmente poner en contacto el polipéptido de fusión aislado con un agente de escisión seleccionado entre el grupo que consiste en ácido fórmico, bromuro de cianógeno (CNBr), hidroxilamina, autoescisión de proteína, Factor Xa, enteroquinasa, ProTEV y proteasa de SUMO.

65 9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente de escisión es ácido fórmico, y en el que la puesta en contacto del polipéptido de fusión aislado con un agente de escisión se realiza en presencia de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % de ácido fórmico a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 36 horas.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que produce una variante de CNP seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 5 PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-CNP37) (SEQ ID NO: 186);
MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-CNP37) (SEQ ID NO: 192);
PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145); y
MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 191).

10 11. Una variante de CNP producida de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la variante de CNP se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 15 PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-CNP37) (SEQ ID NO: 186);
MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-CNP37) (SEQ ID NO: 192);
PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145); y
MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 191).

12. Una variante de CNP para su uso en un método para aumentar el crecimiento de huesos largos, en el que la variante de CNP se selecciona entre:

- 20 (SEQ ID NO: 192) MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-CNP37);
(SEQ ID NO: 186) PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-CNP37);
(SEQ ID NO: 145) PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37)); y
(SEQ ID NO: 191) MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSMSGLGC (Met-Gly-CNP37)).

FIGURA 1

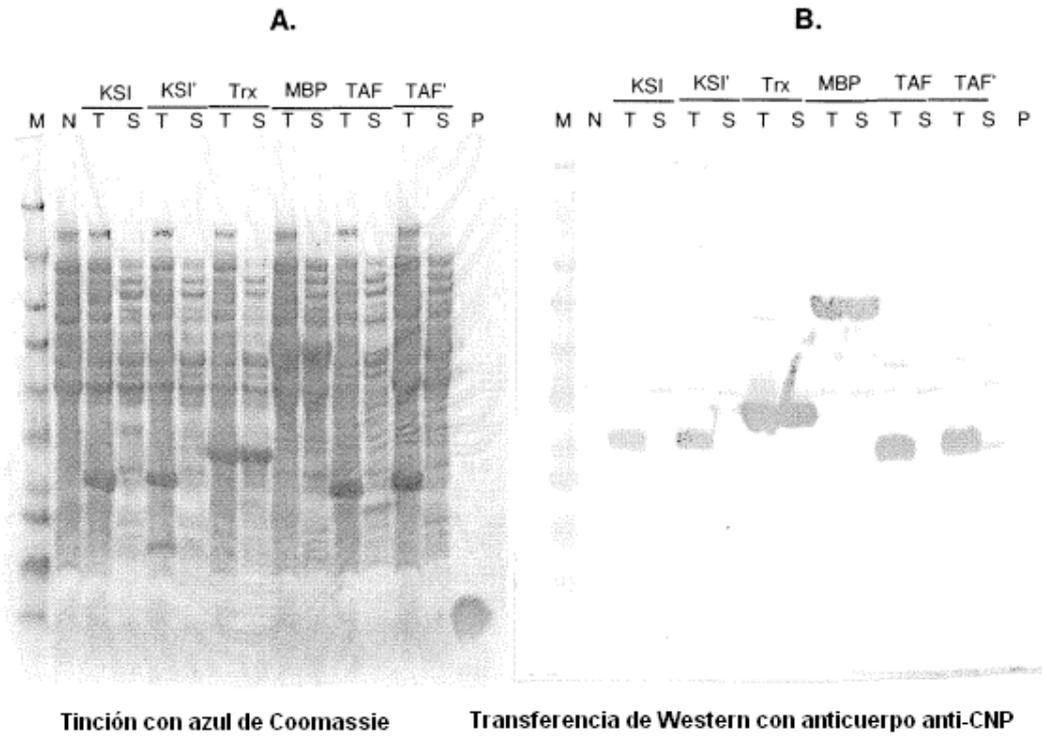


FIGURA 2

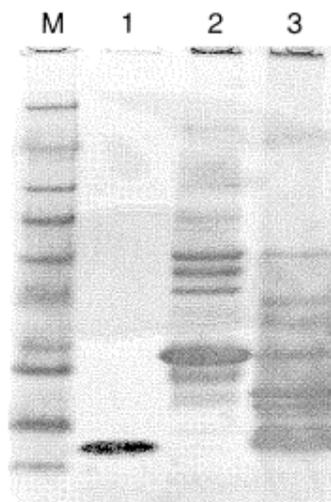


FIGURA 3

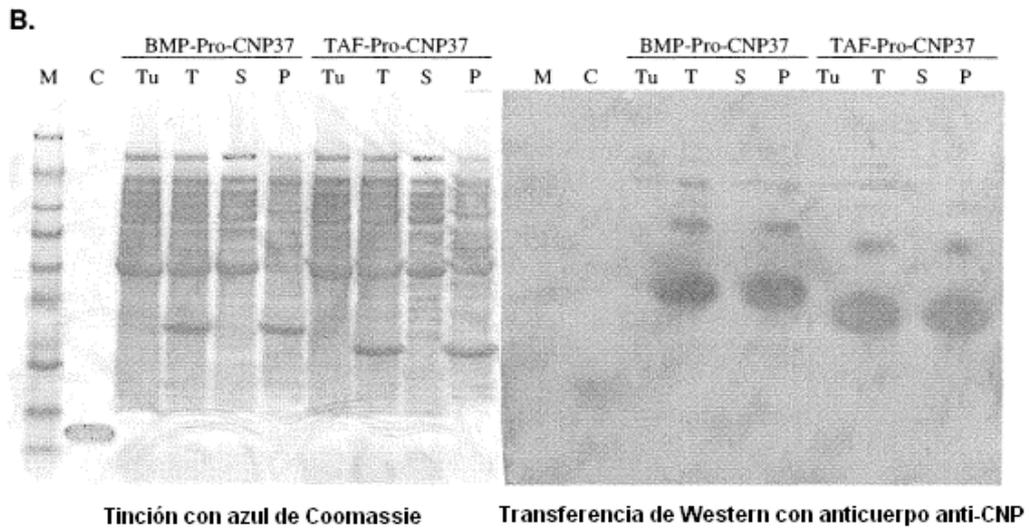
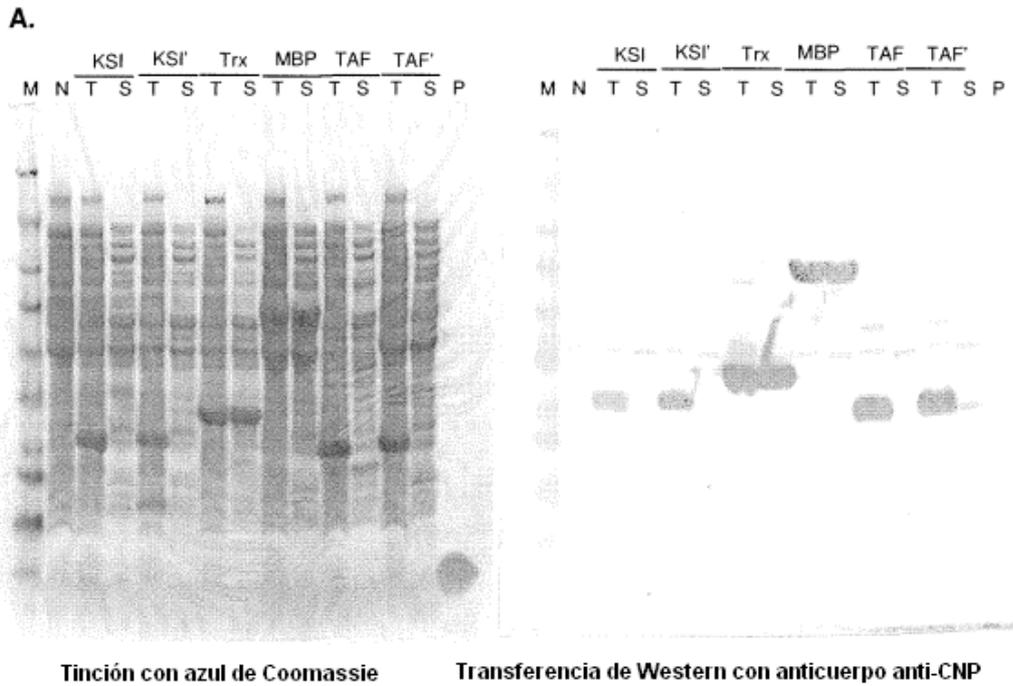


FIGURA 3 continuación

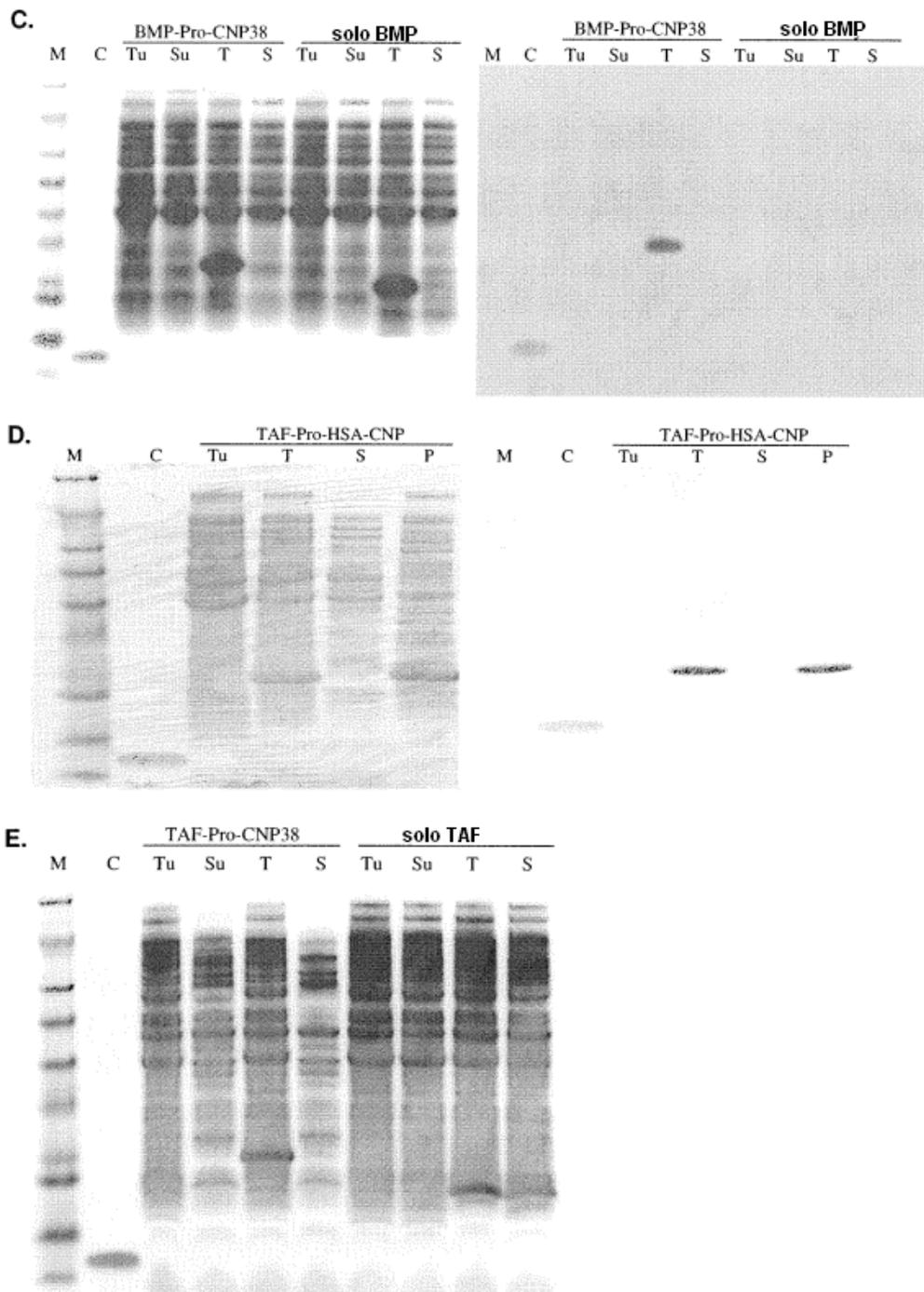


FIGURA 4

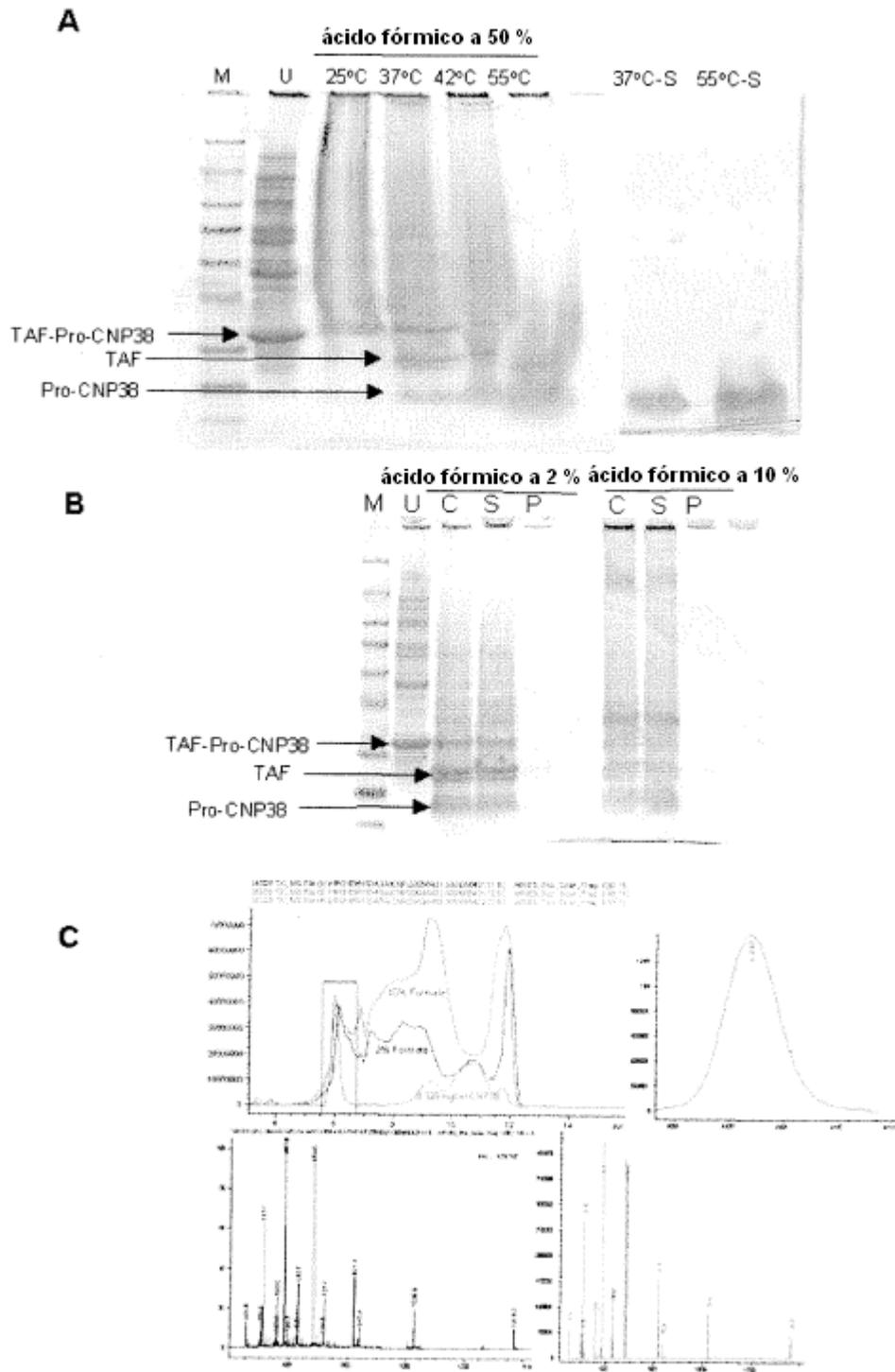


FIGURA 5

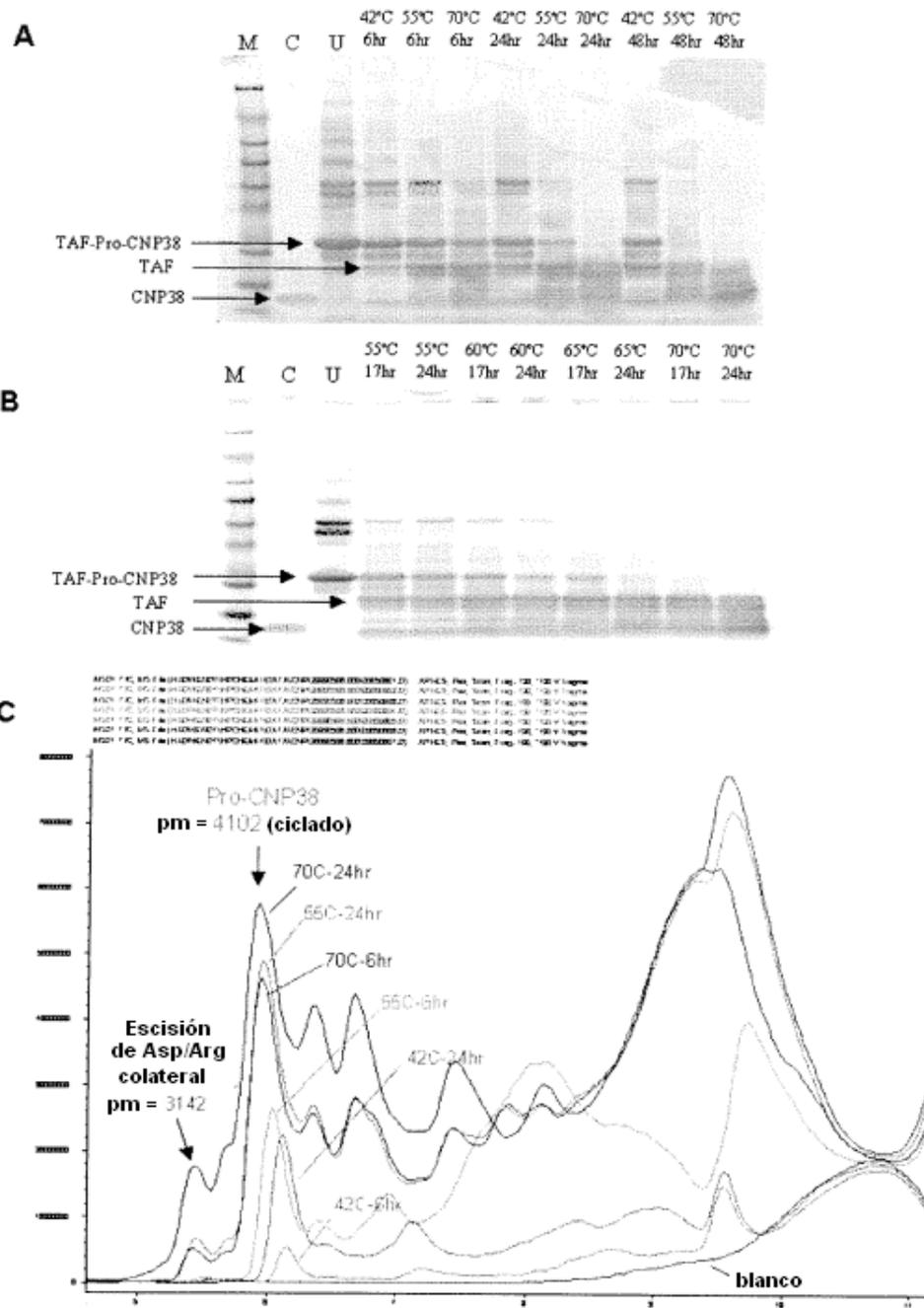


FIGURA 6

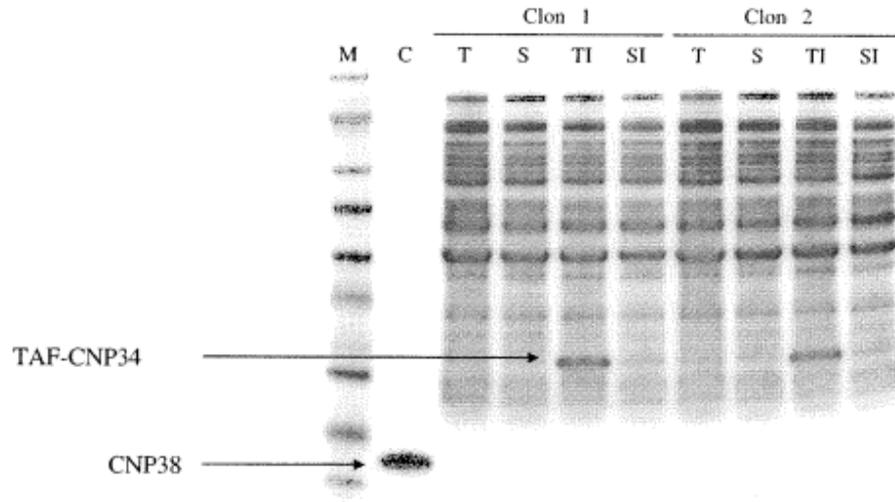


FIGURA 7

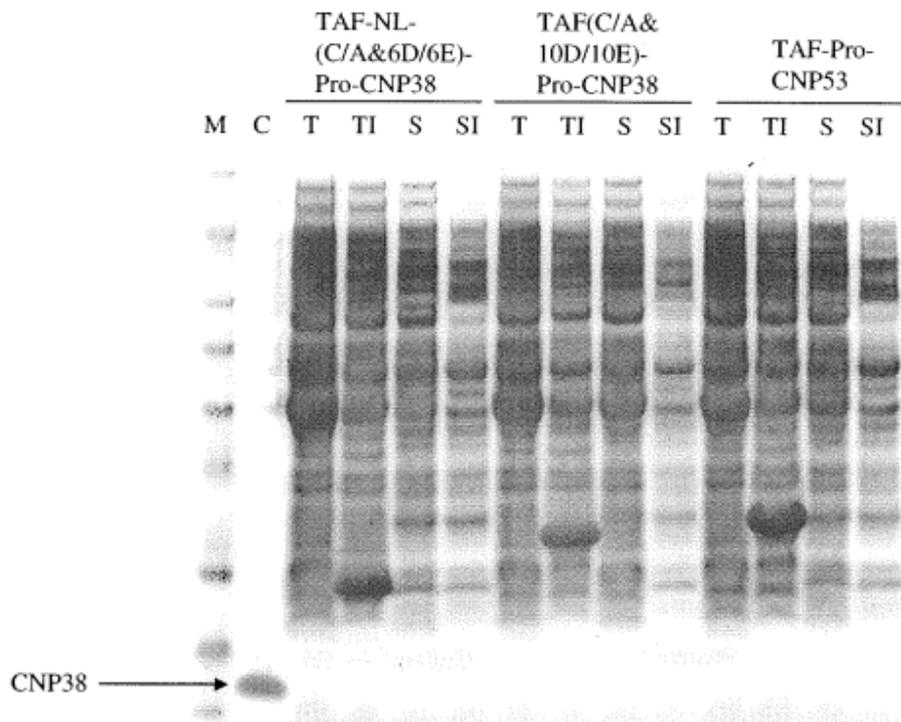


FIGURA 10

Masa monoisotópica de Pro-CNP53 cal. = 5898,14

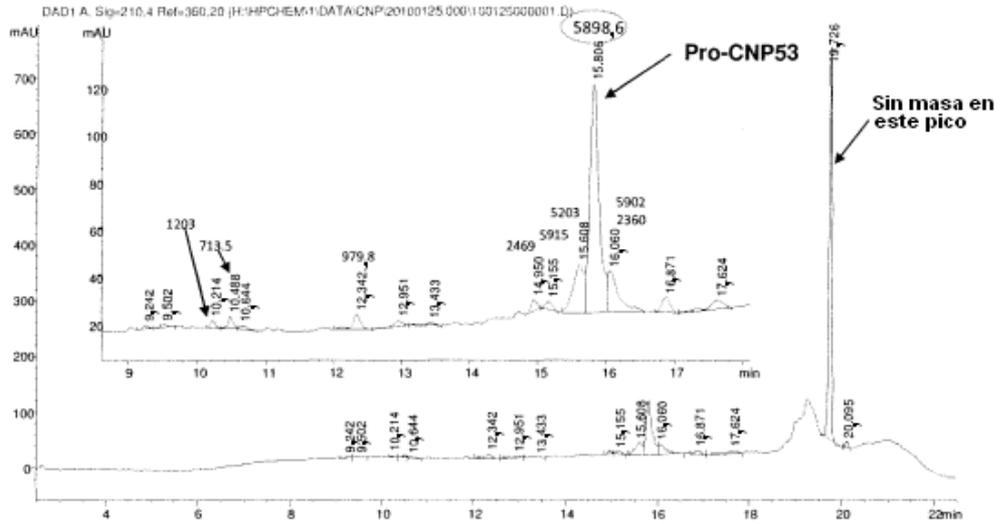


FIGURA 11

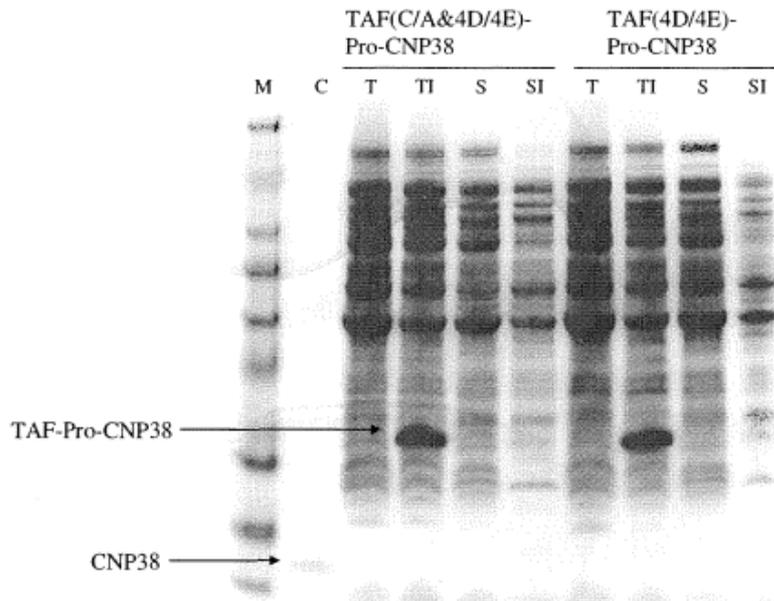


FIGURA 12

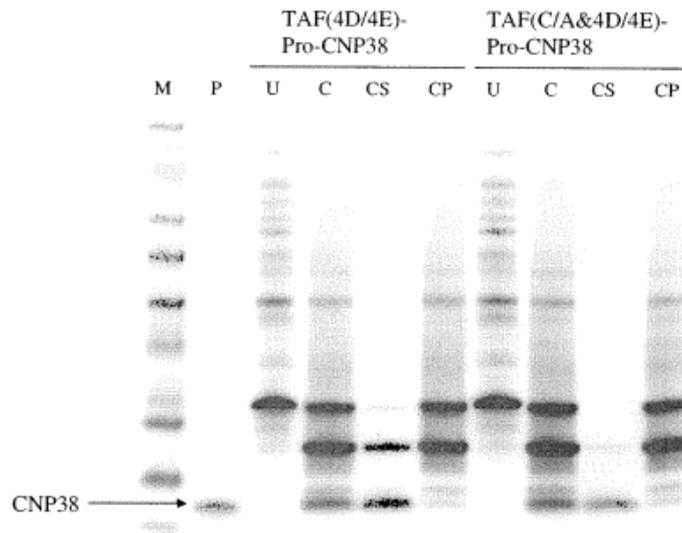


FIGURA 13

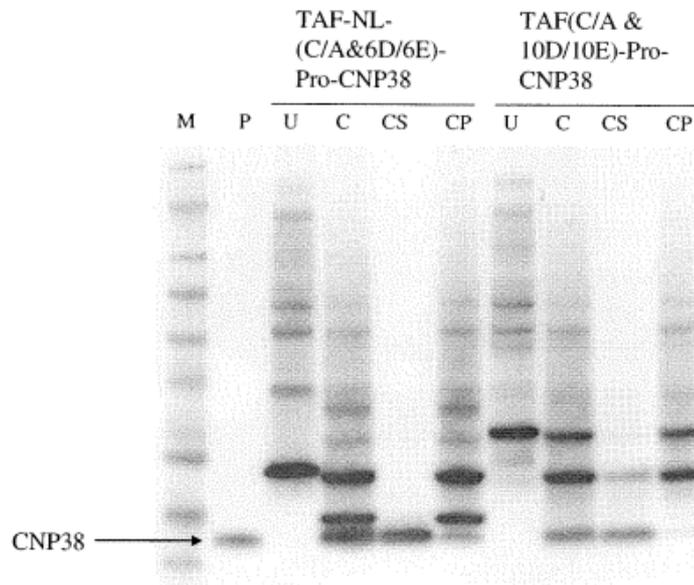


FIGURA 14

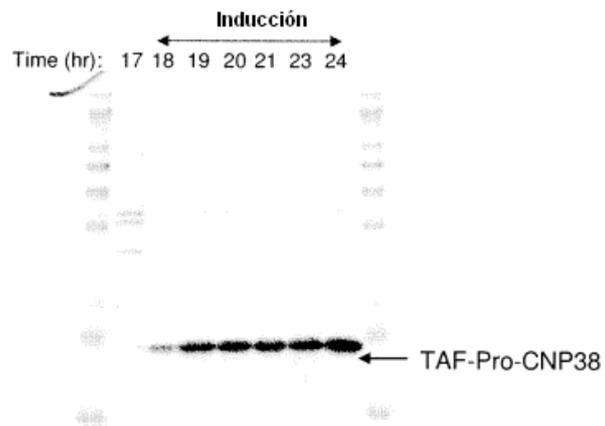


FIGURA 15

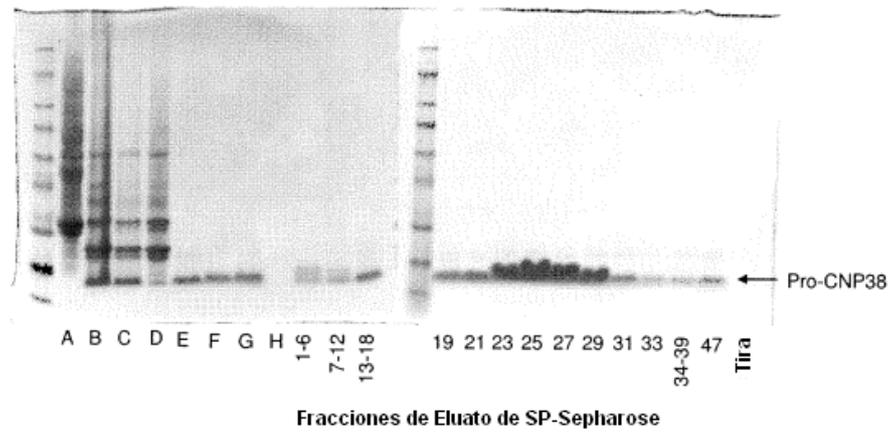


FIGURA 16

Digestión con NEP de conjugados de CNP22-PEG

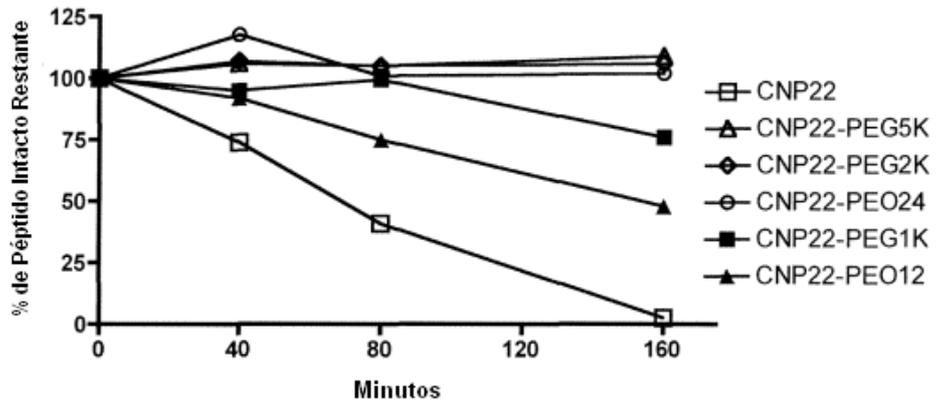


FIGURA 17

Digestión con NEP de Extensiones N-terminales de CNP

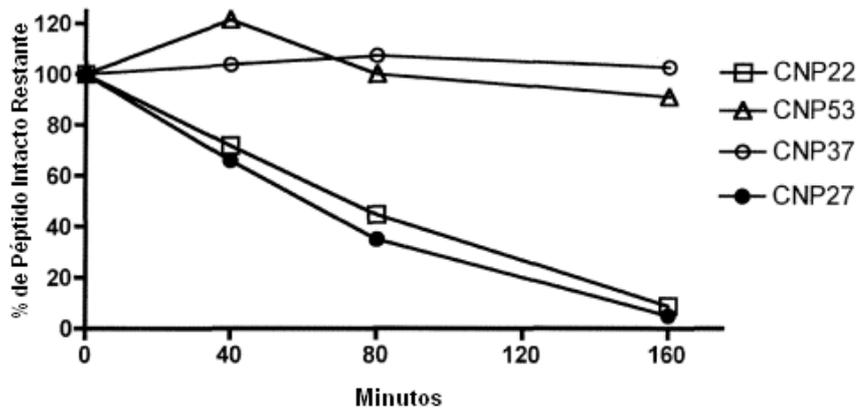


FIGURA 18

Digestión con NEP de Extensiones N-terminales de CNP

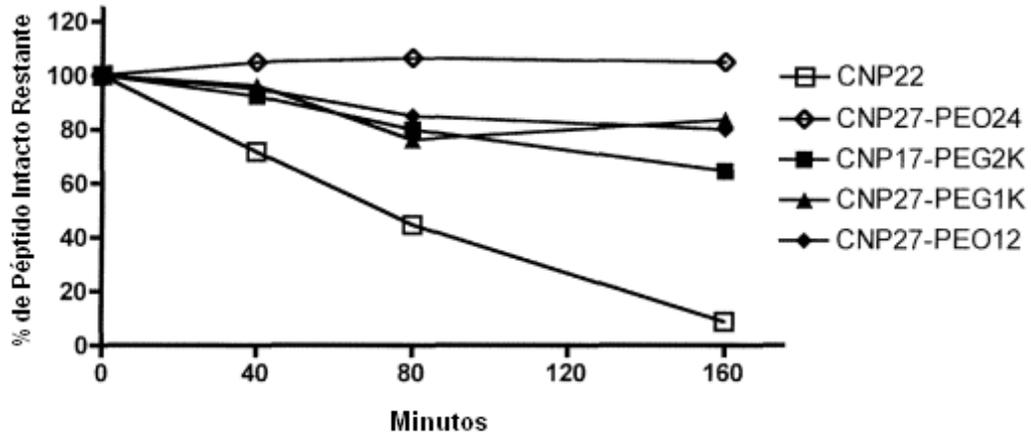


FIGURA 19

Digestión con NEP de Extensiones N-terminales de CNP

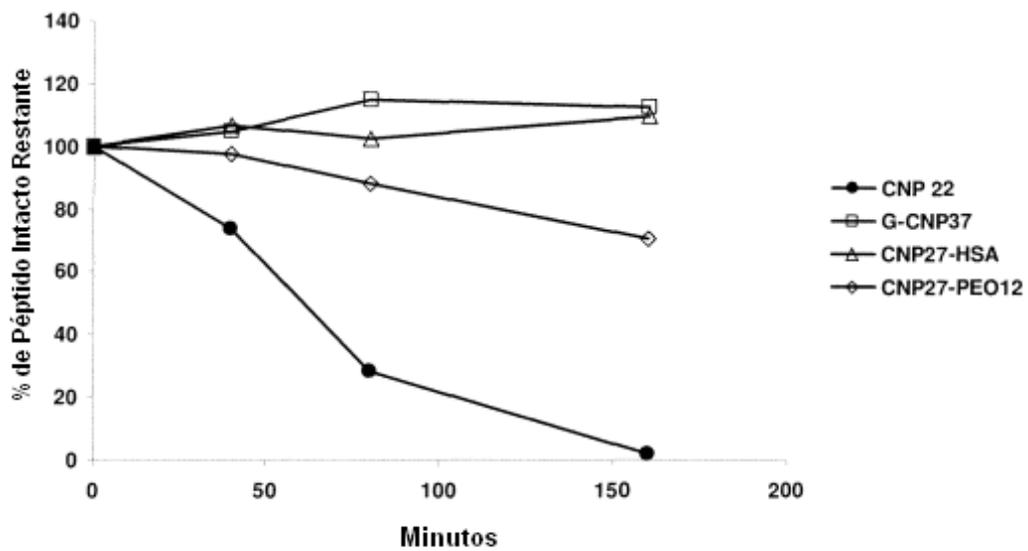


FIGURA 20

Células NIH3T3 estimuladas por extensión N-terminal de CNP - respuesta de cGMP

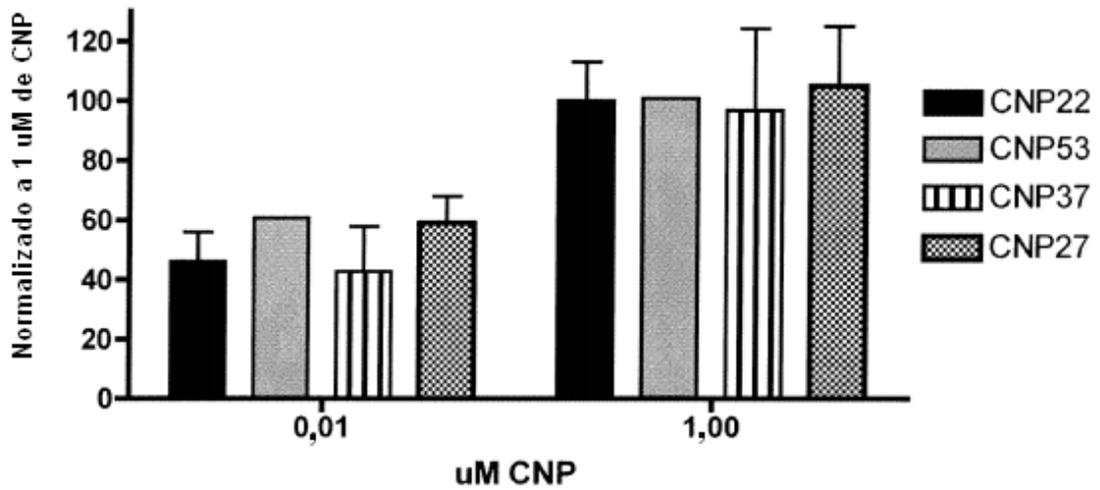


FIGURA 21

Células NIH3T3 estimuladas por PEG N-terminal de CNP - respuesta de cGMP

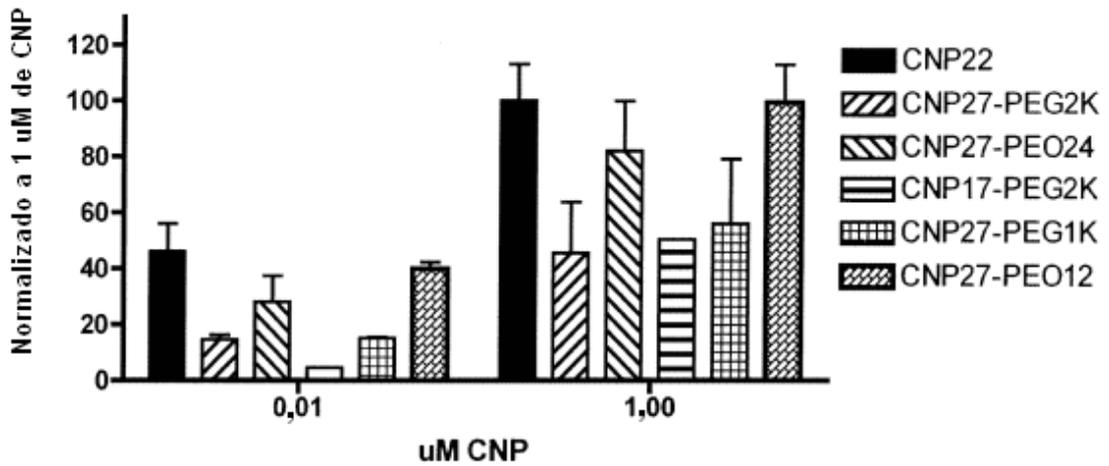


FIGURA 22

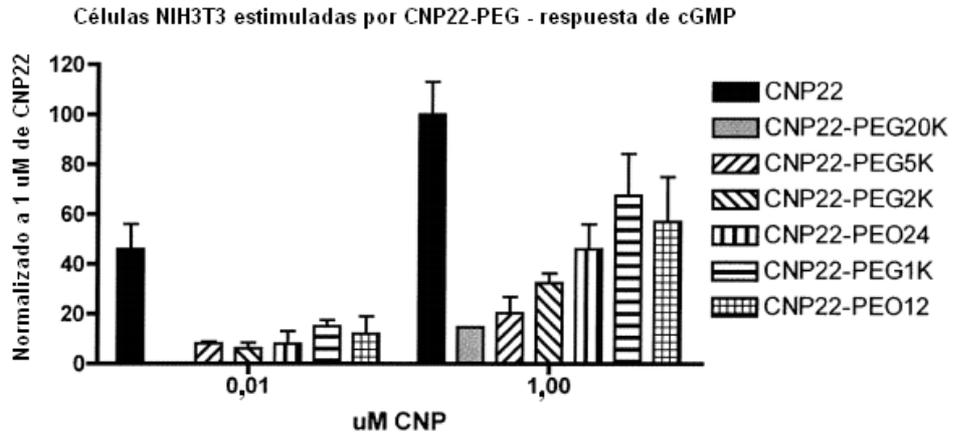


FIGURA 23

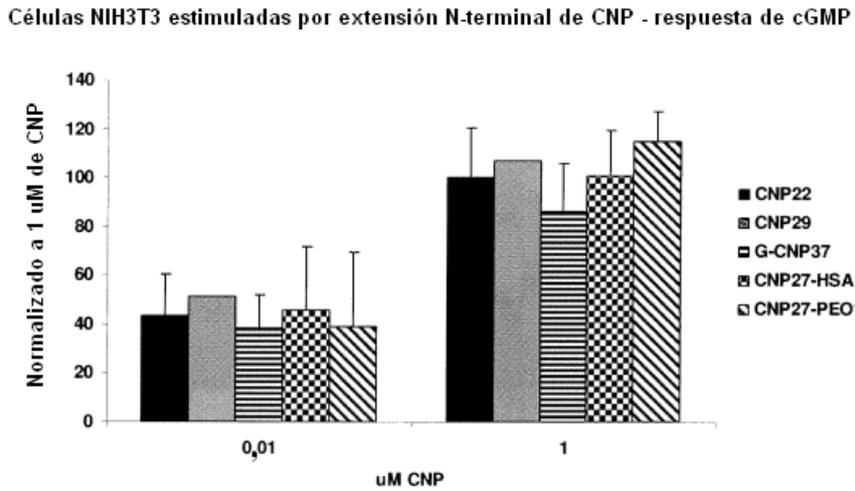
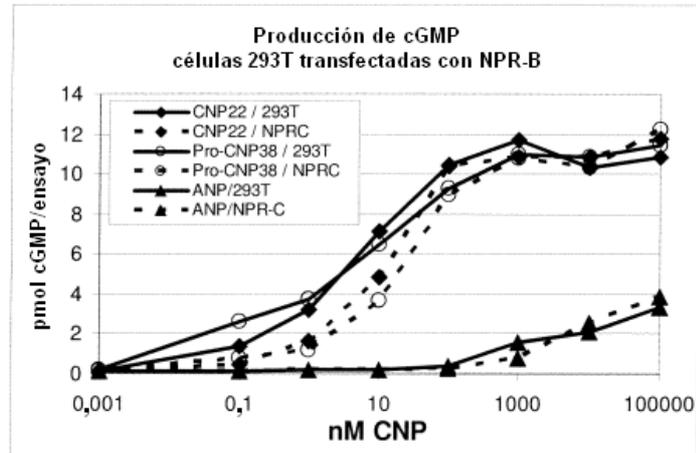


FIGURA 24

A.



B.

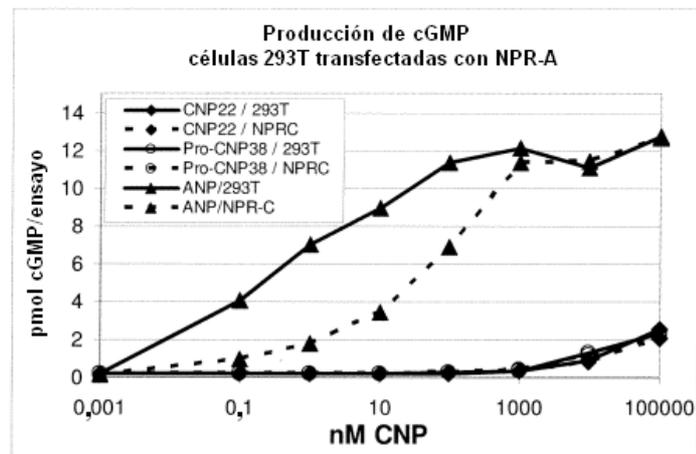
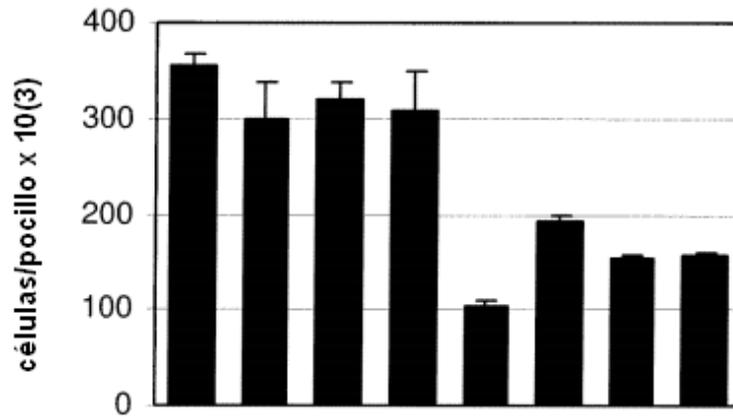


FIGURA 25



Barras de izquierda a derecha:

1 control (sin CNP22, sin FGF2)
2 CNP22 (0,2 uM) continuo
3 CNP22 (0,2 uM) 1 hr una vez al día
4 CNP22 (0,2 uM) 2 hr una vez al día
5 FGF2 (5 ng/ml) continuo
6 FGF2 + CNP22 (0,2 uM) continuo
7 FGF2+CNP22 (0,2 uM) 1 hr diariamente
8 FGF2+CNP22 (0,2 uM) 2 hr diariamente

FIGURA 26

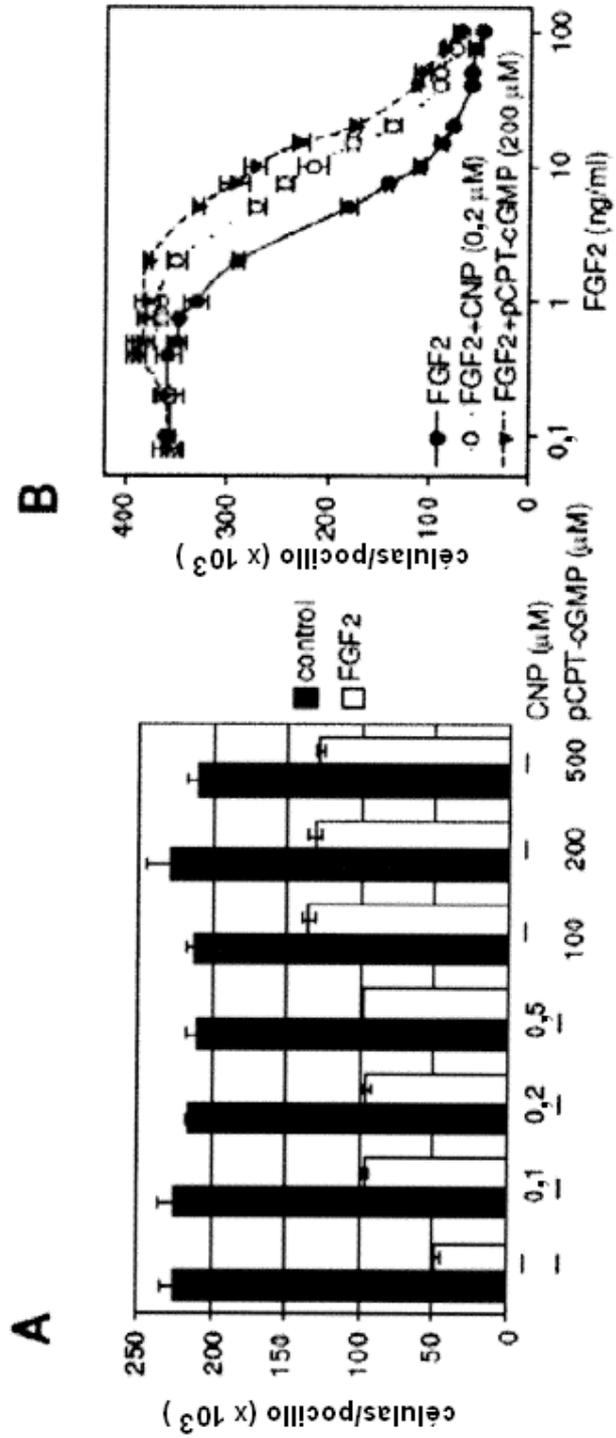


FIGURA 27

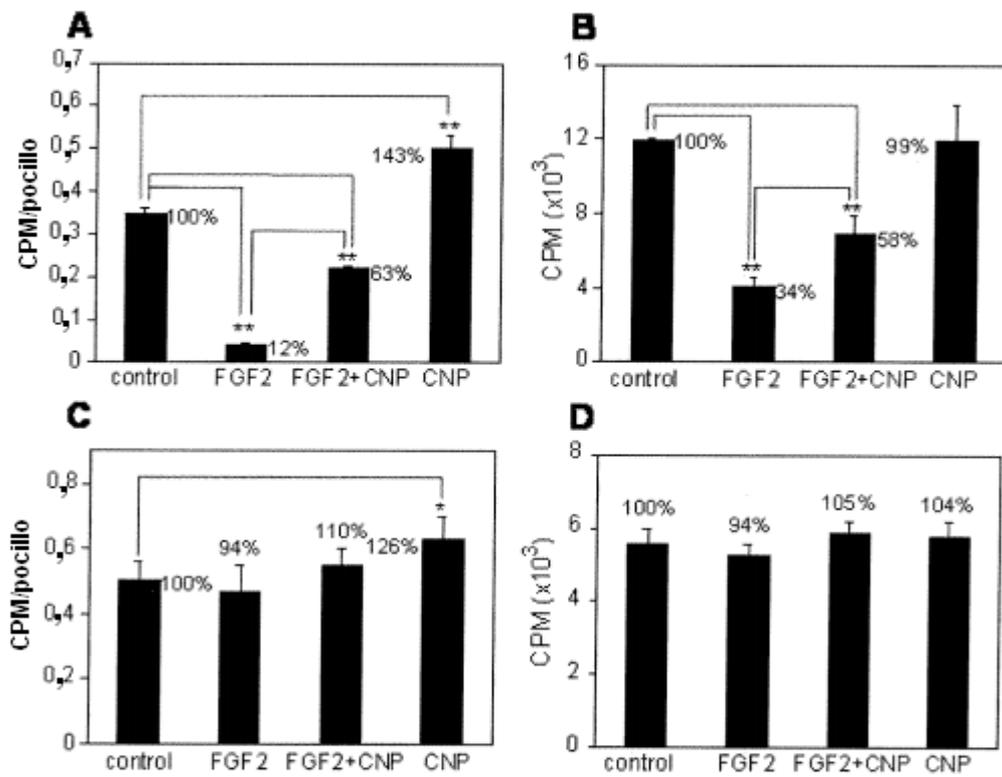


FIGURA 28

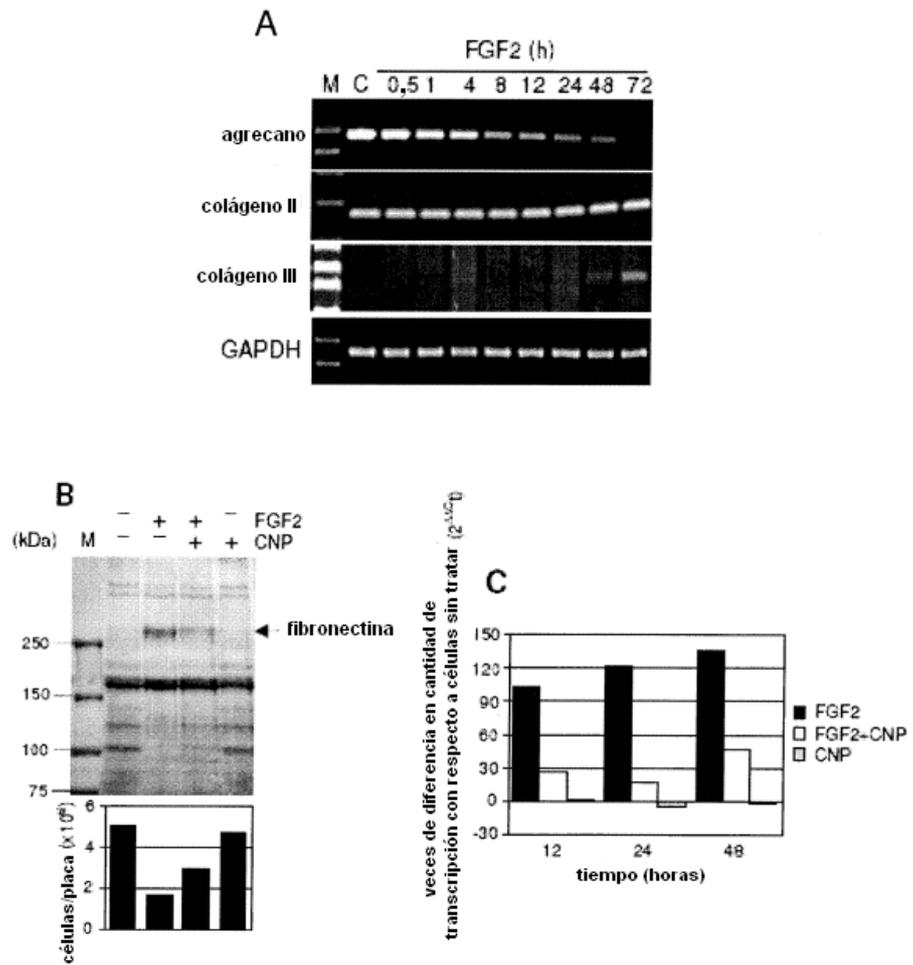


FIGURA 29

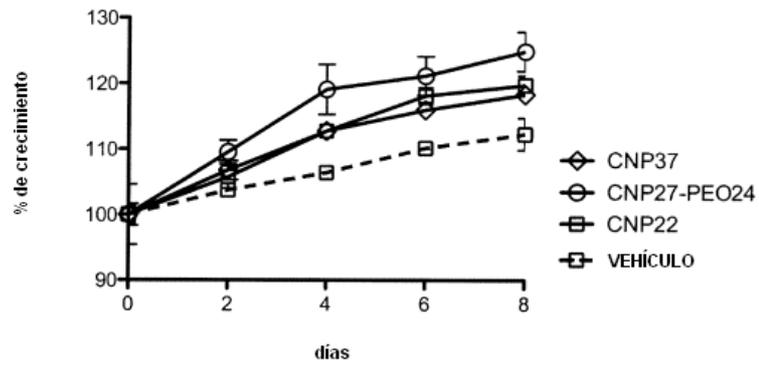


FIGURA 30

Tibia WT

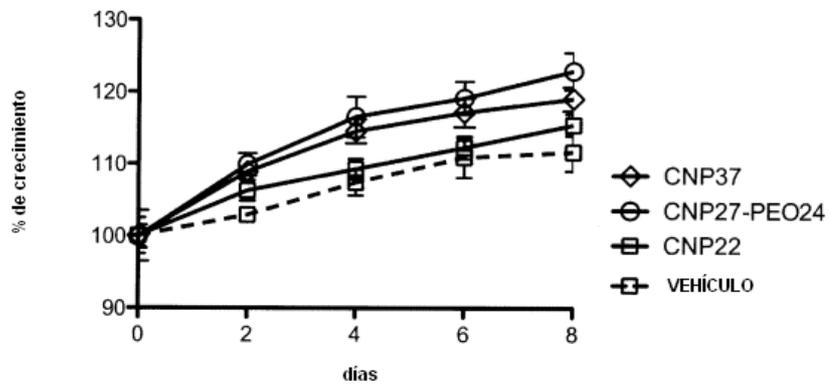


FIGURA 31

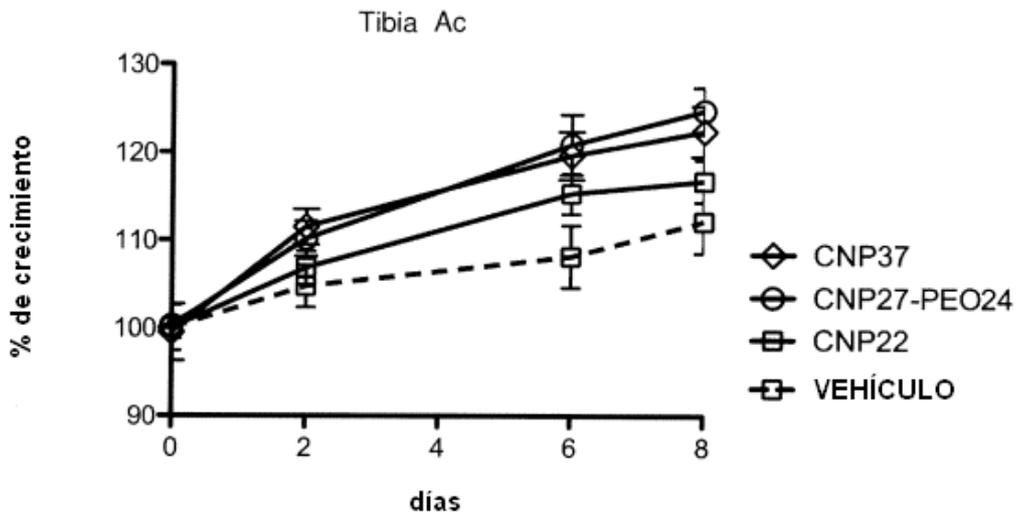


FIGURA 32

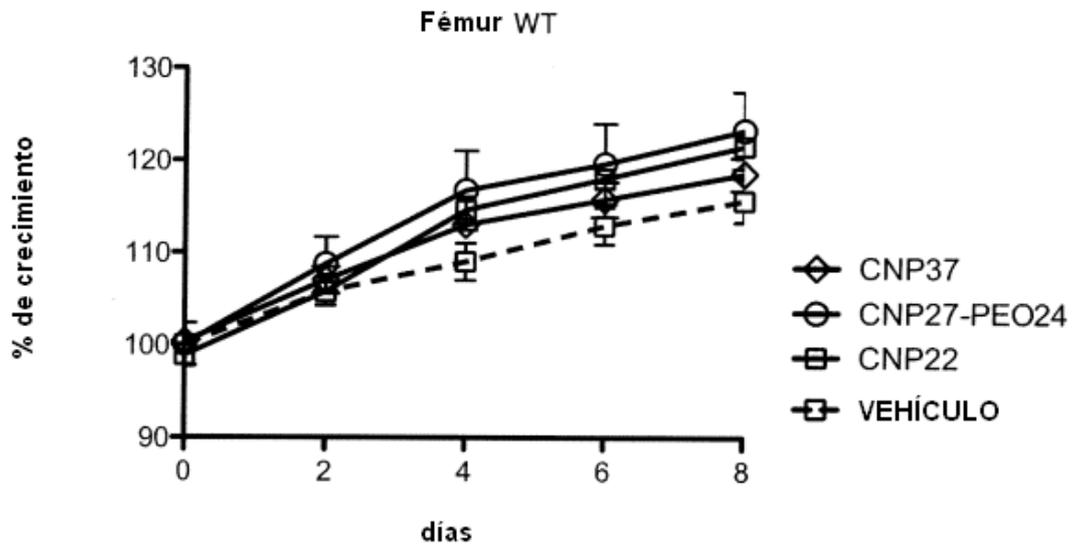


FIGURA 33

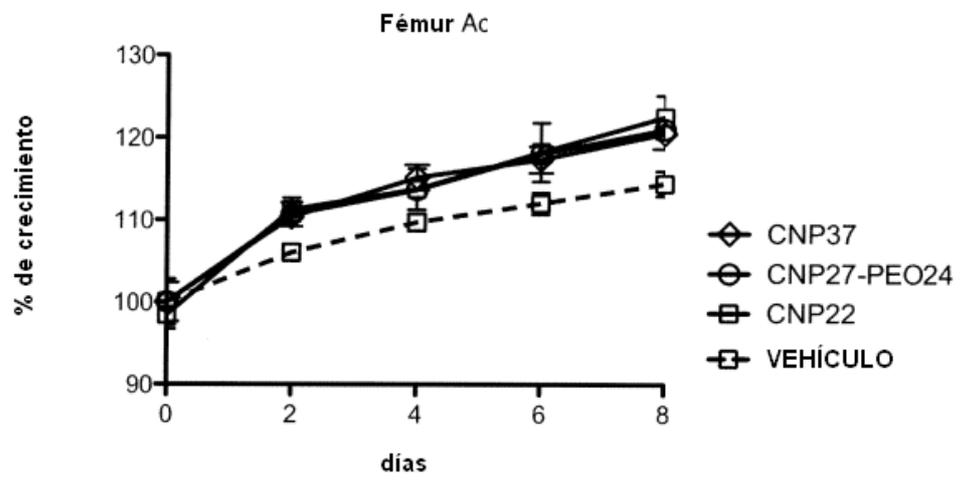


FIGURA 34

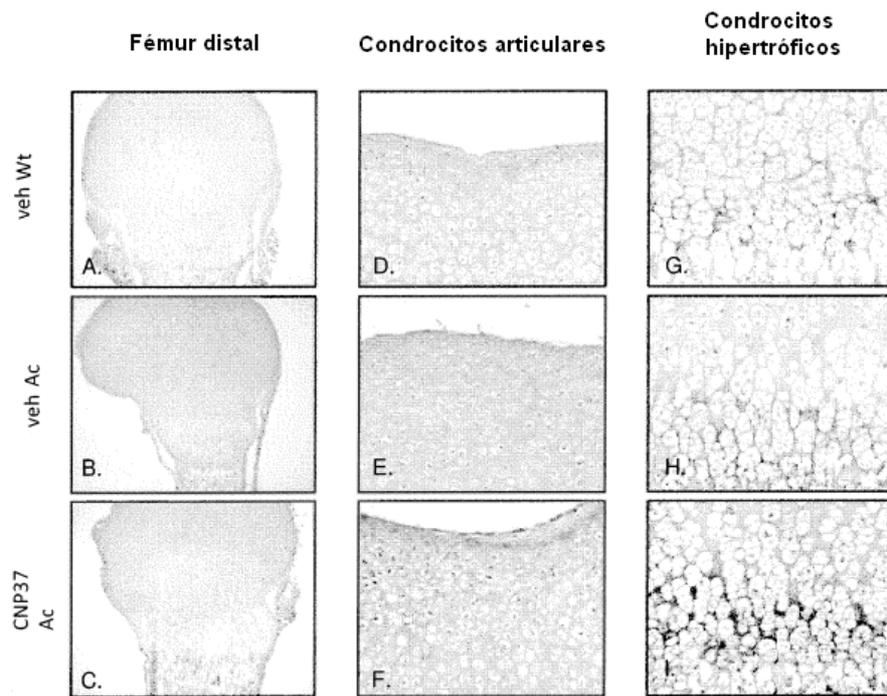


FIGURA 35

Celularidad de Columnas Proliferantes
Sin tratamiento

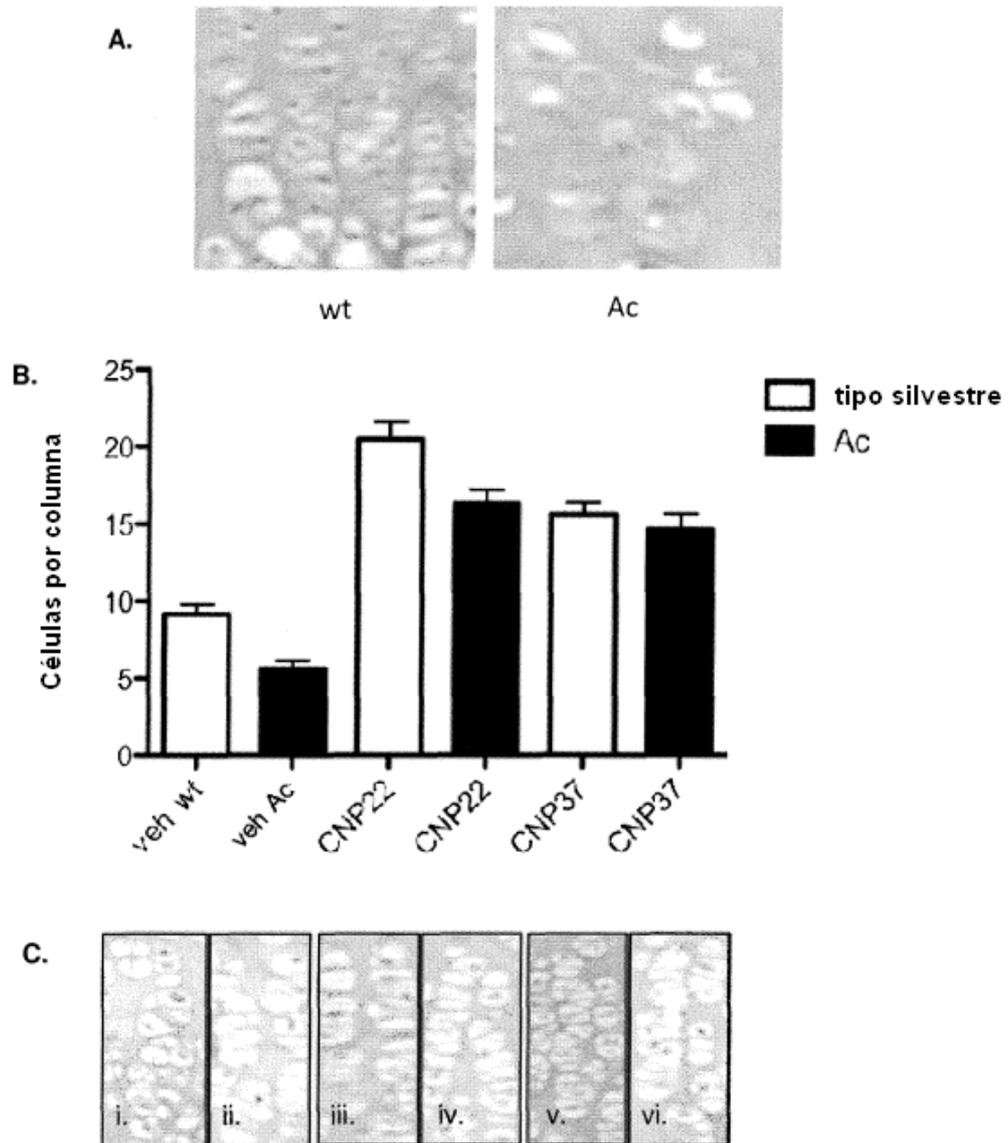


FIGURA 36

Hipertrofia condrocítica

Sin tratamiento

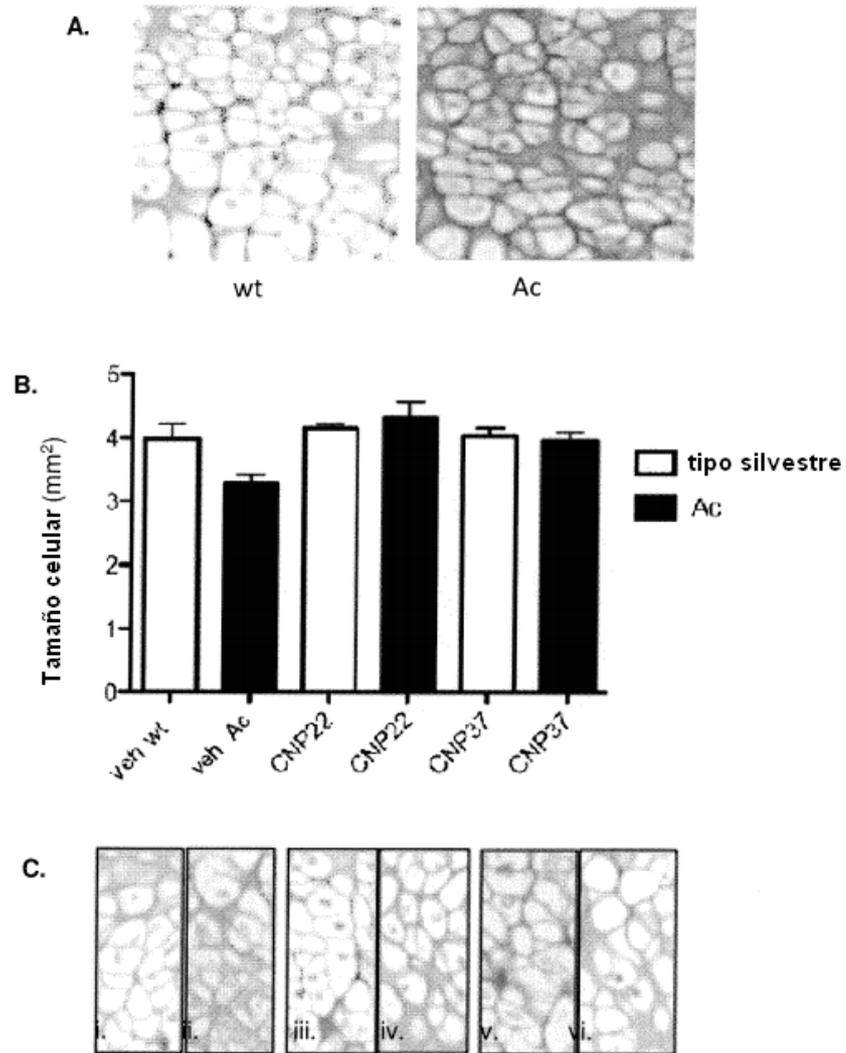


FIGURA 37

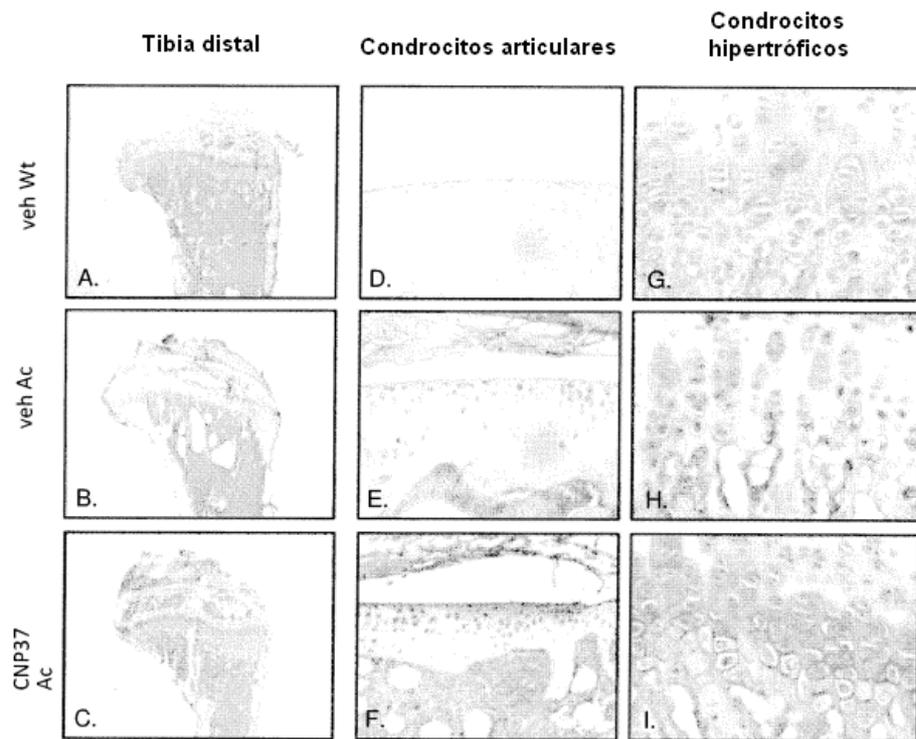


FIGURA 38

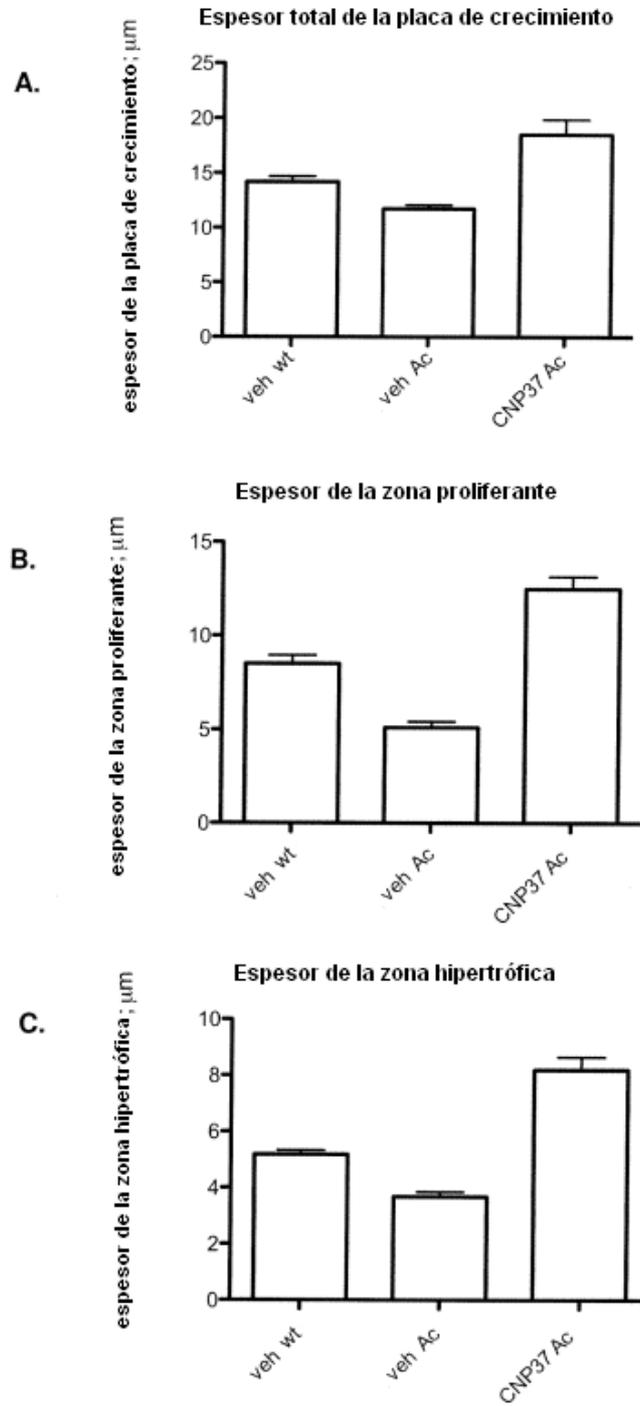


FIGURA 39

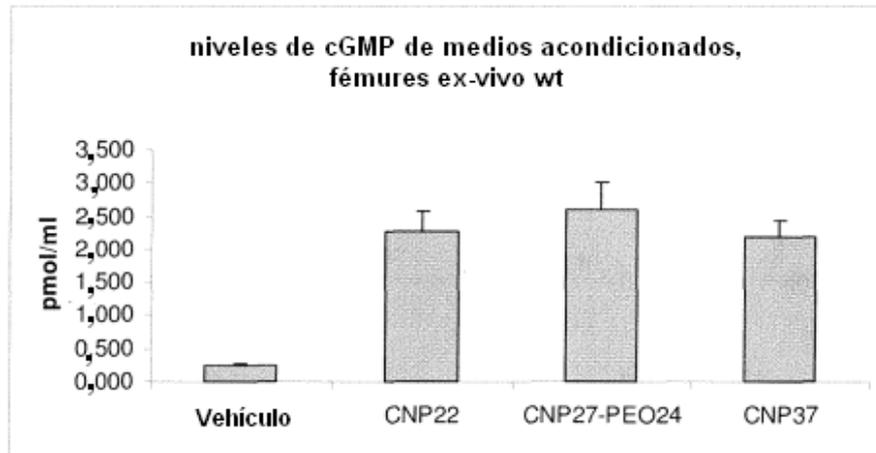


FIGURA 40

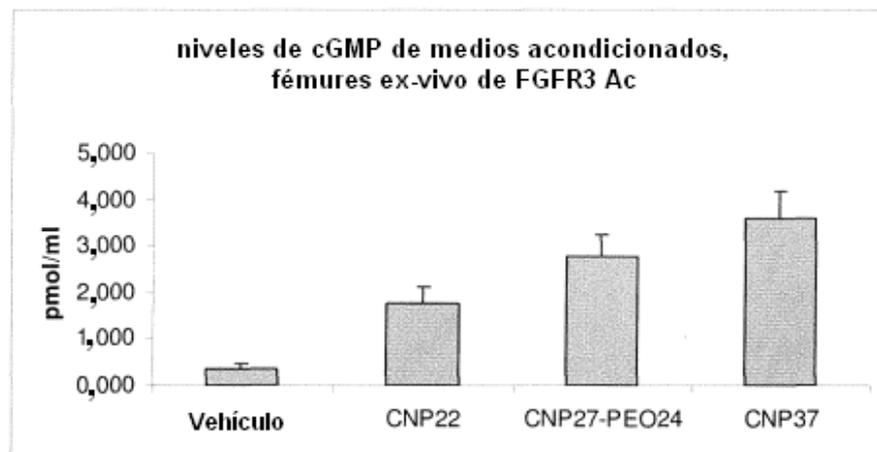


FIGURA 41

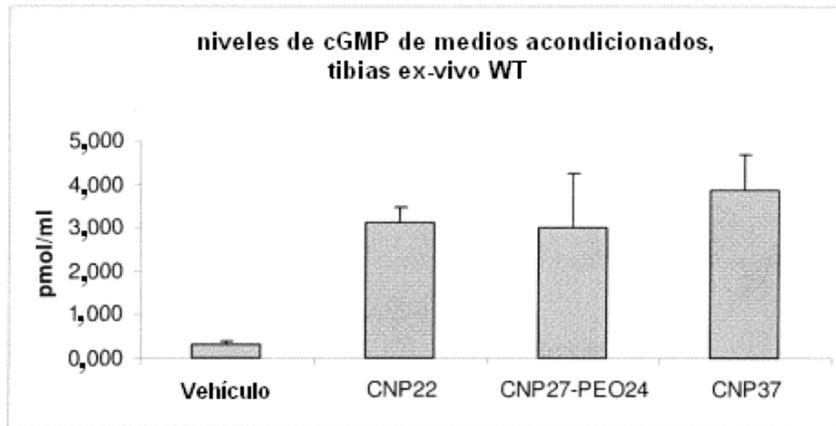


FIGURA 42

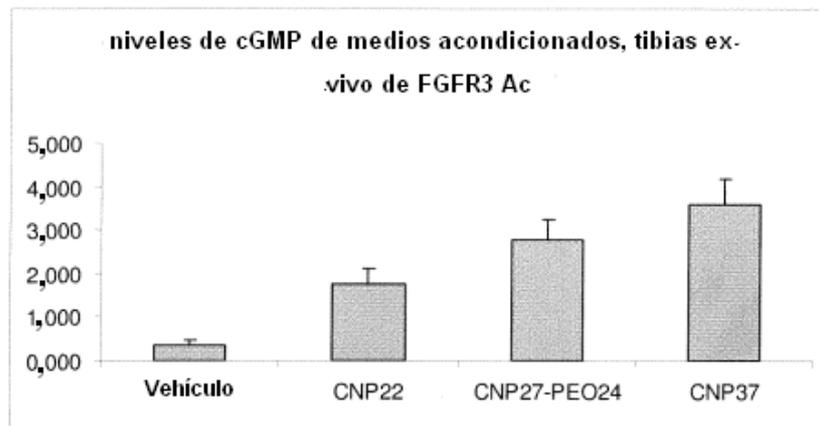


FIGURA 43

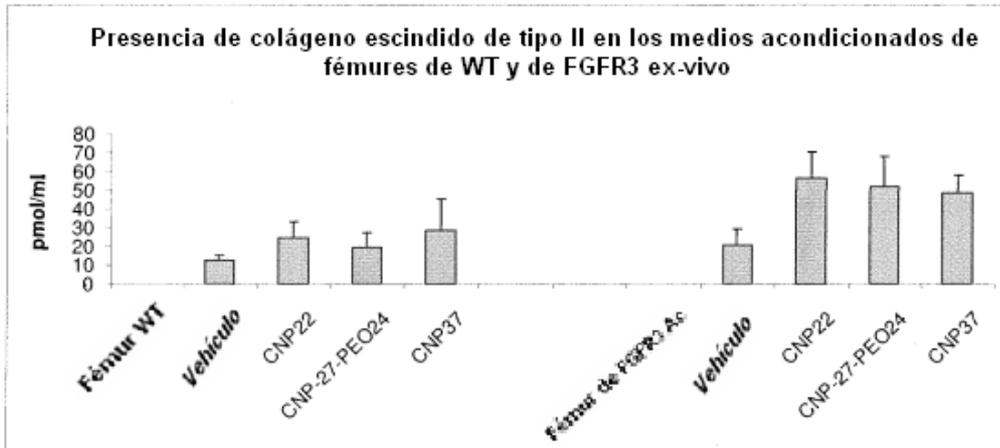


FIGURA 44

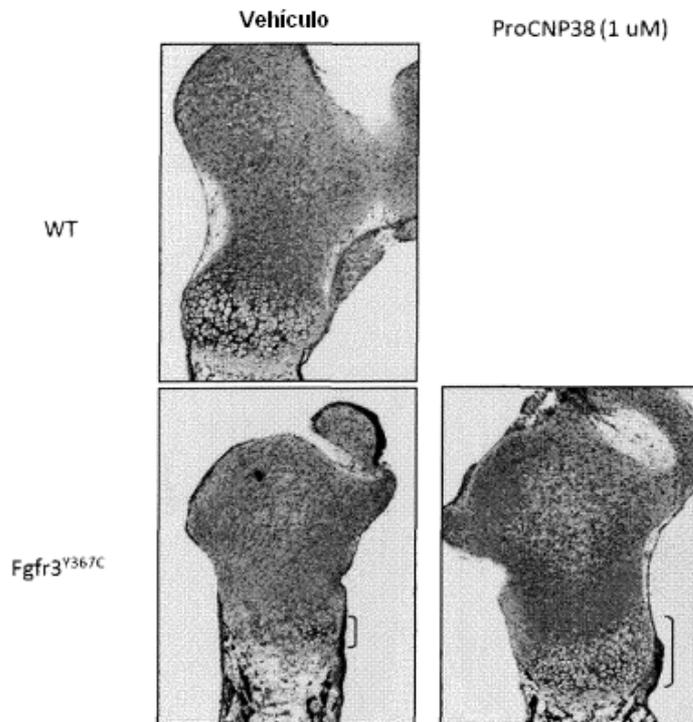


FIGURA 45

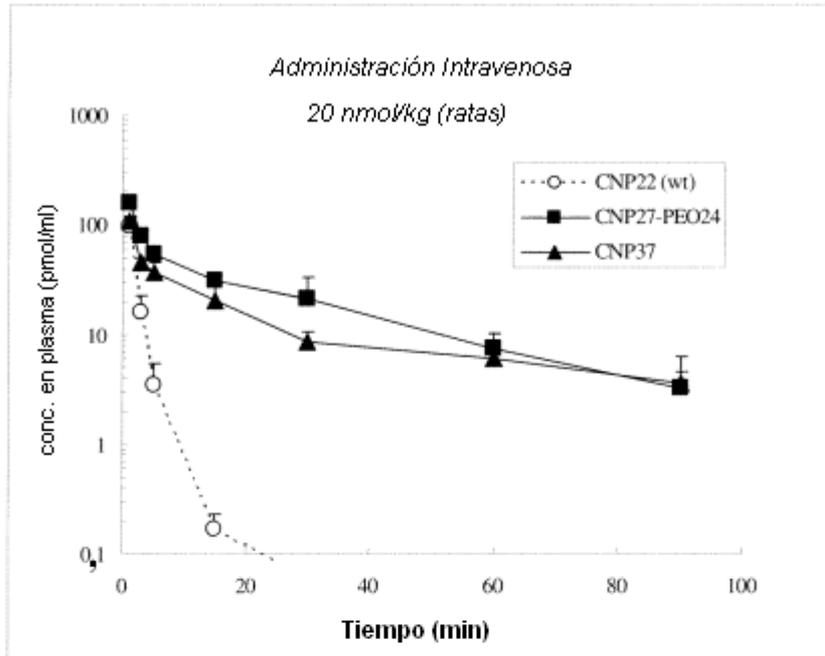


FIGURA 46

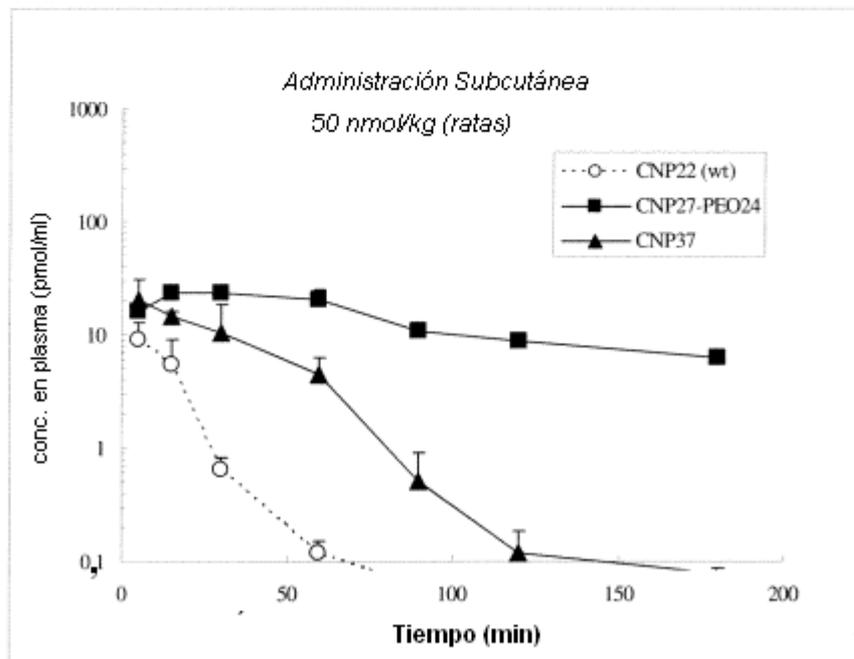


FIGURA 47

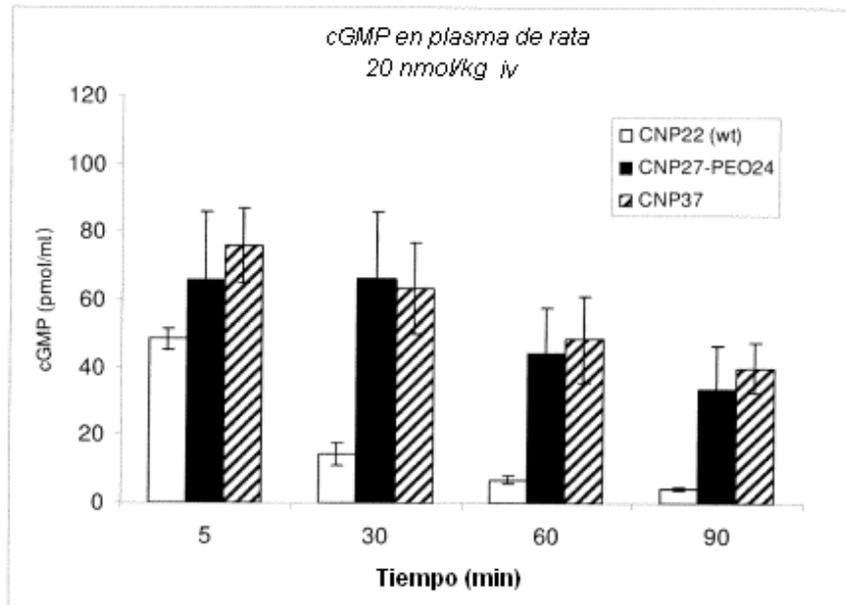


FIGURA 48

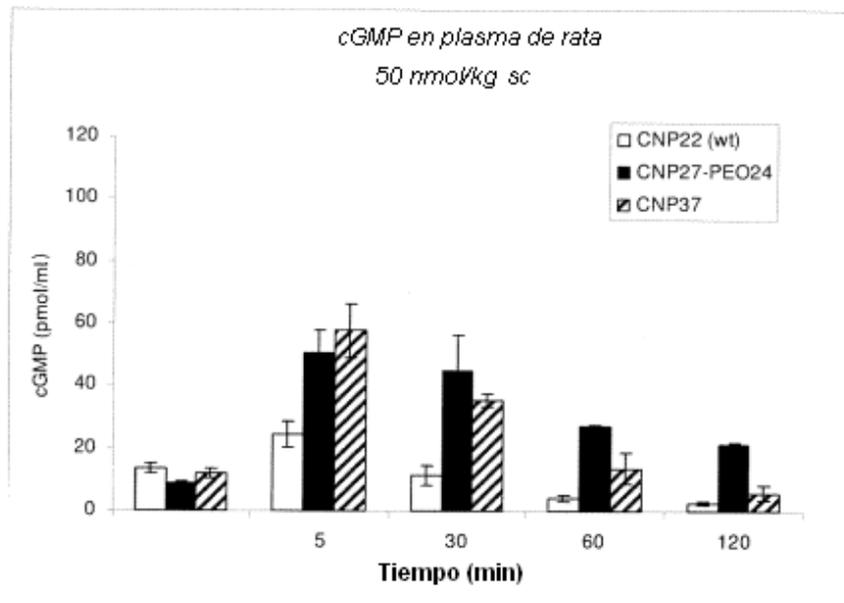


FIGURA 49

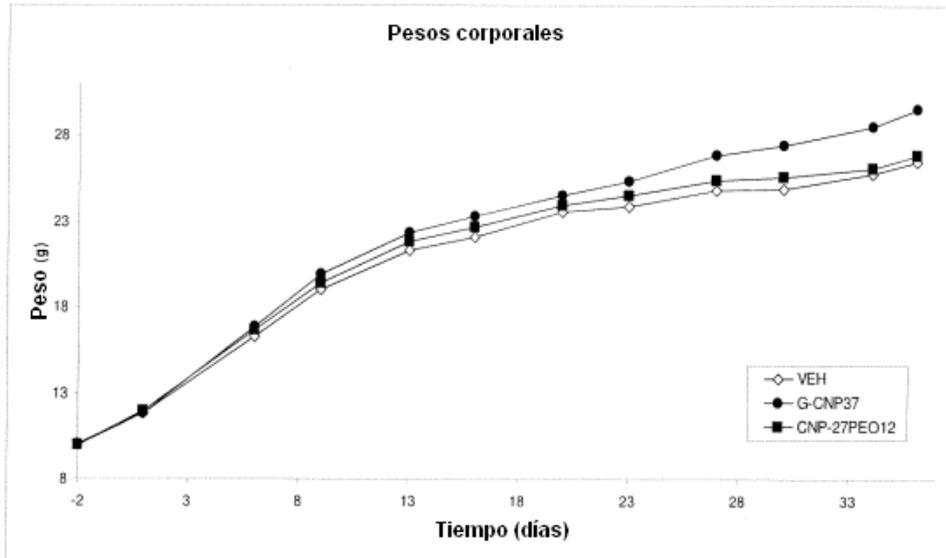


FIGURA 50

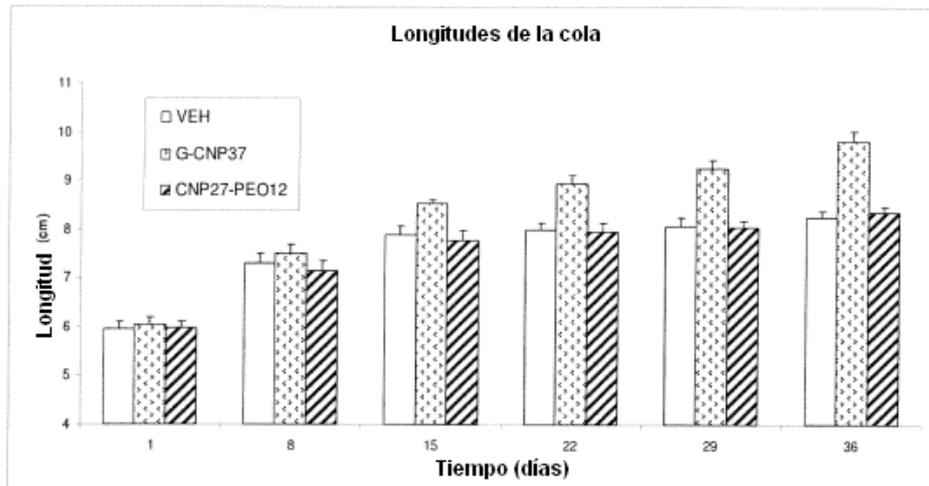


FIGURA 51

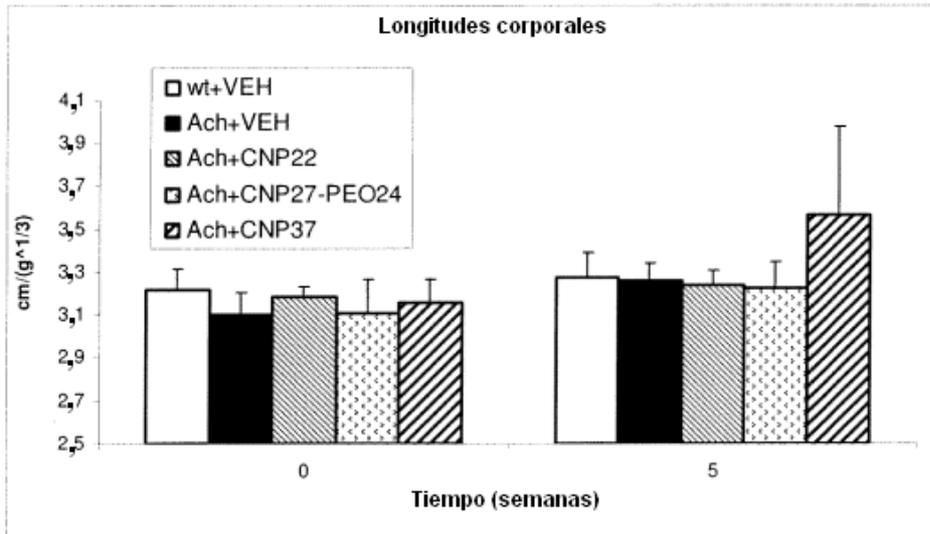


FIGURA 52

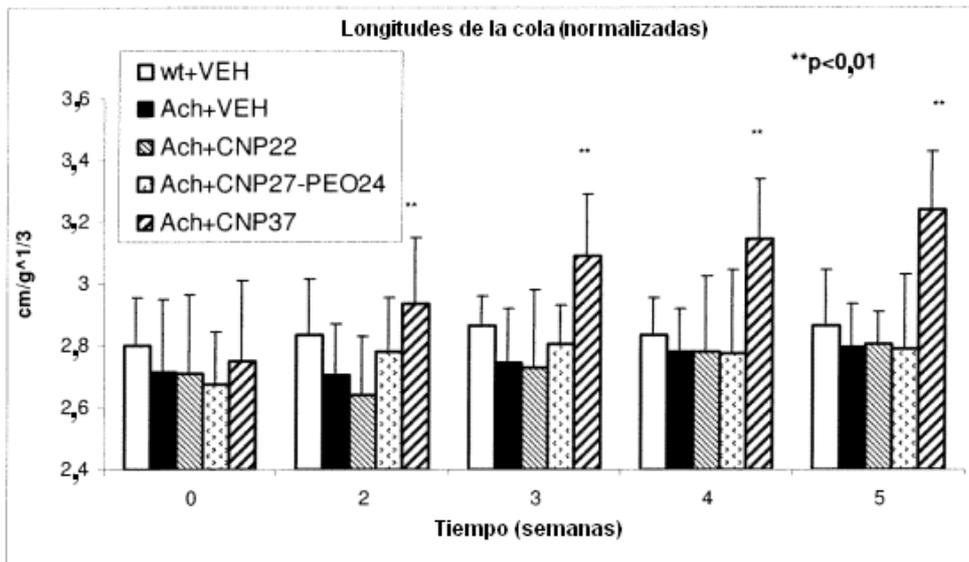
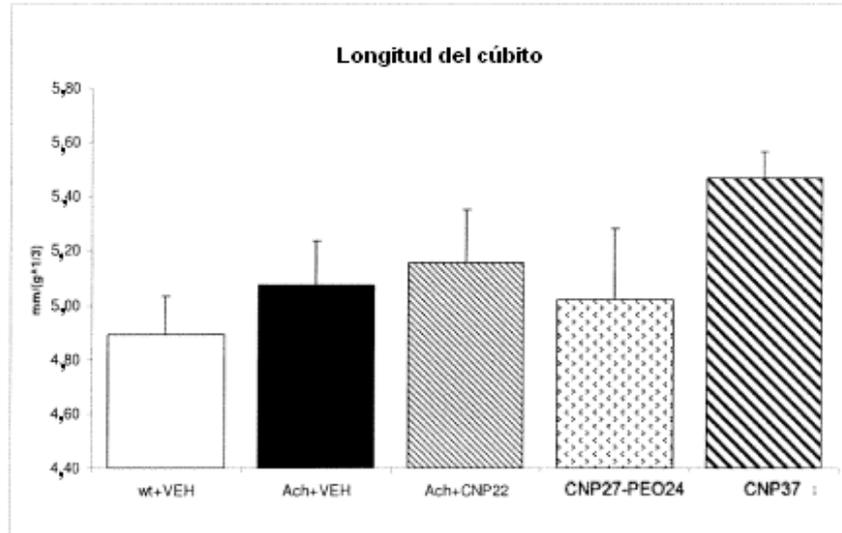


FIGURA 53

A.



B.

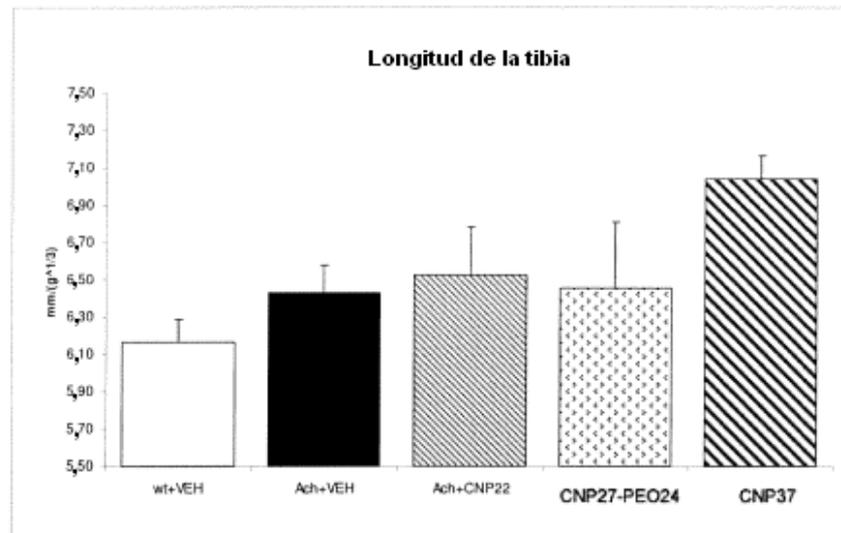


FIGURA 54

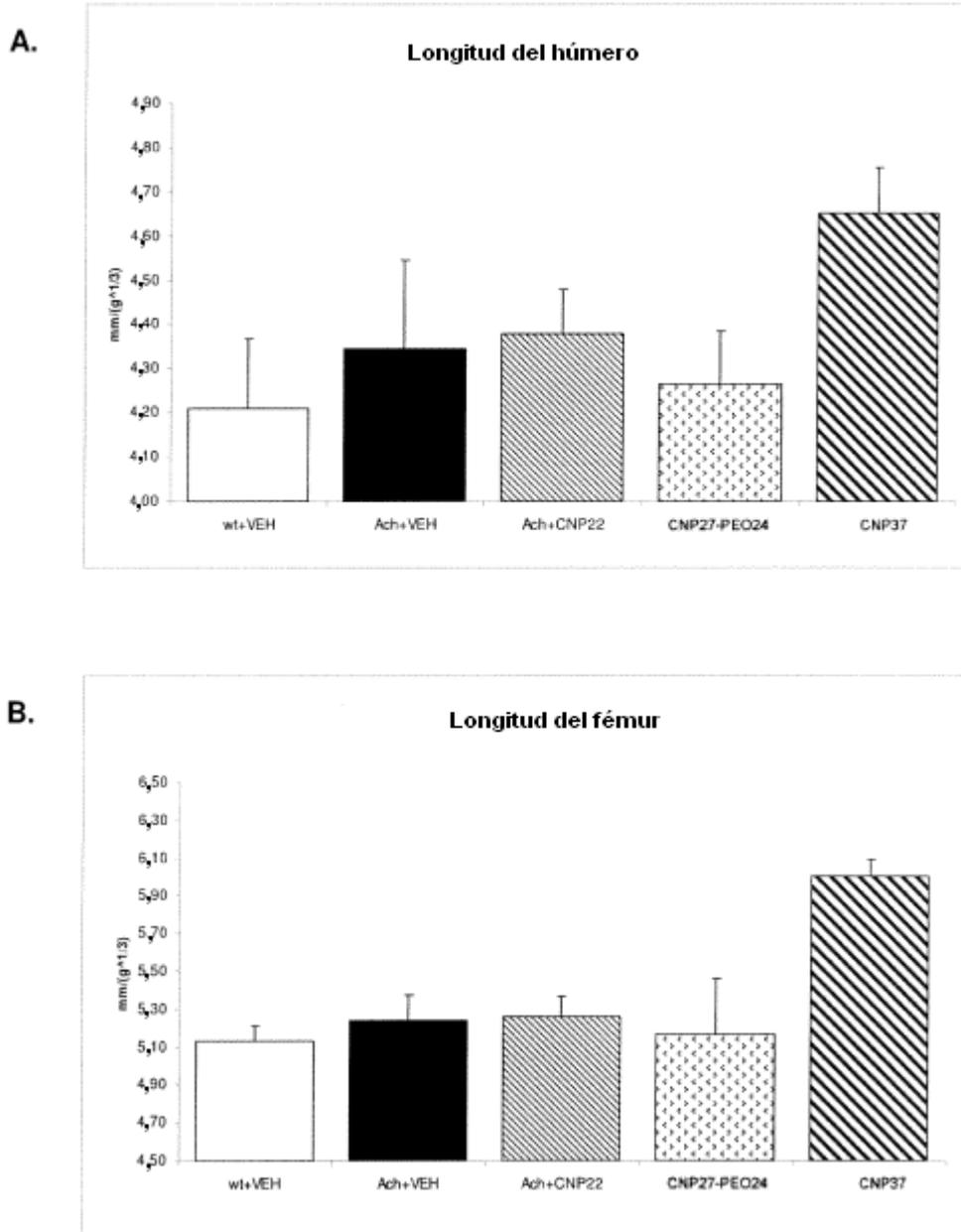


FIGURA 55

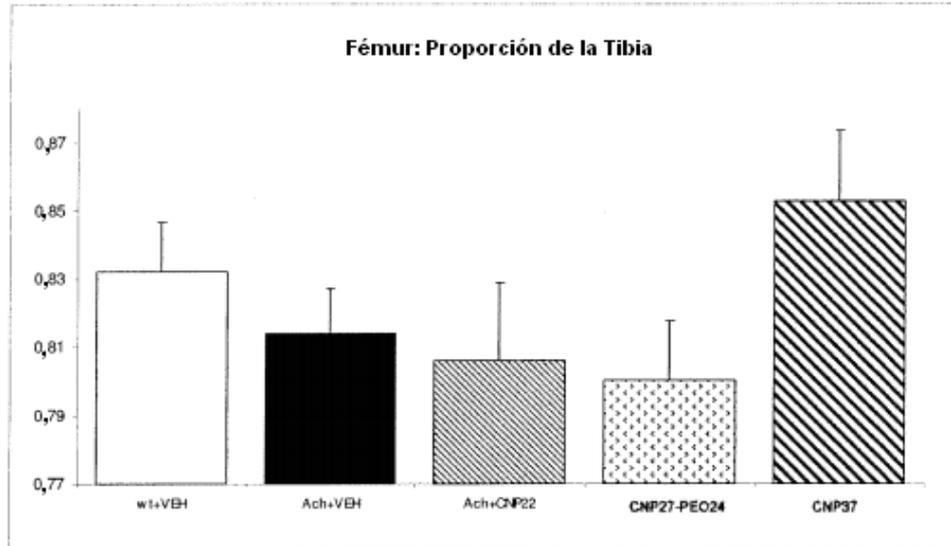


FIGURA 56

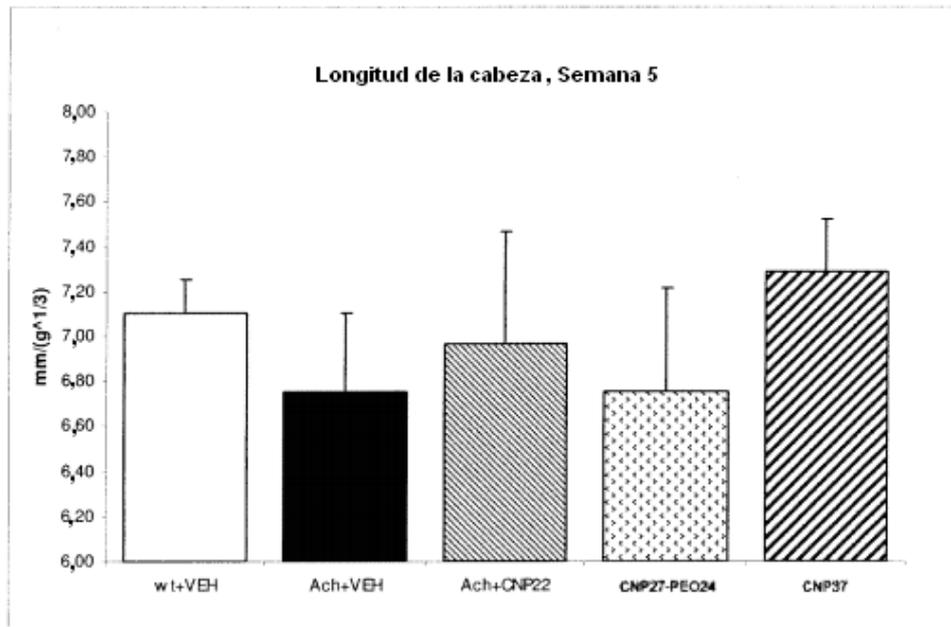


FIGURA 57

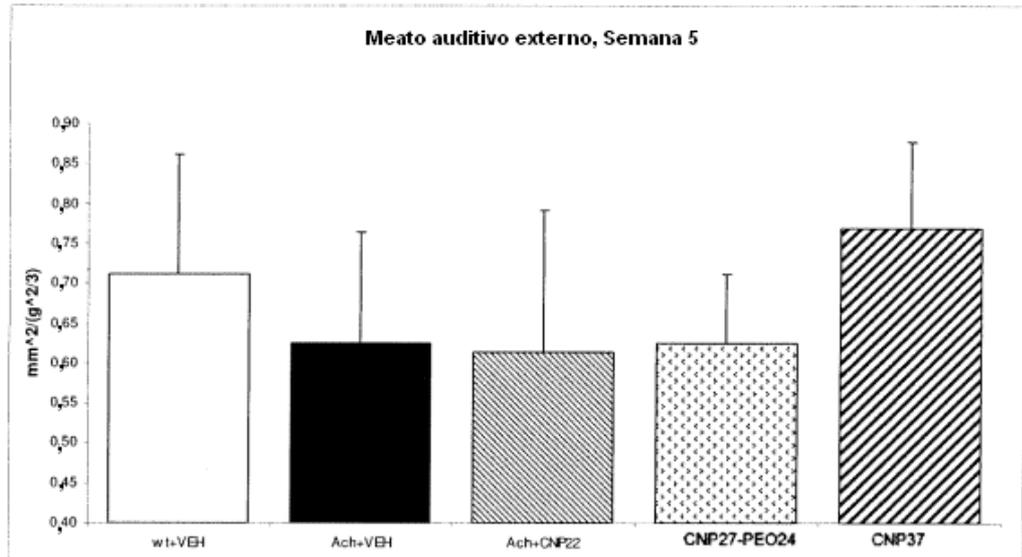


FIGURA 58

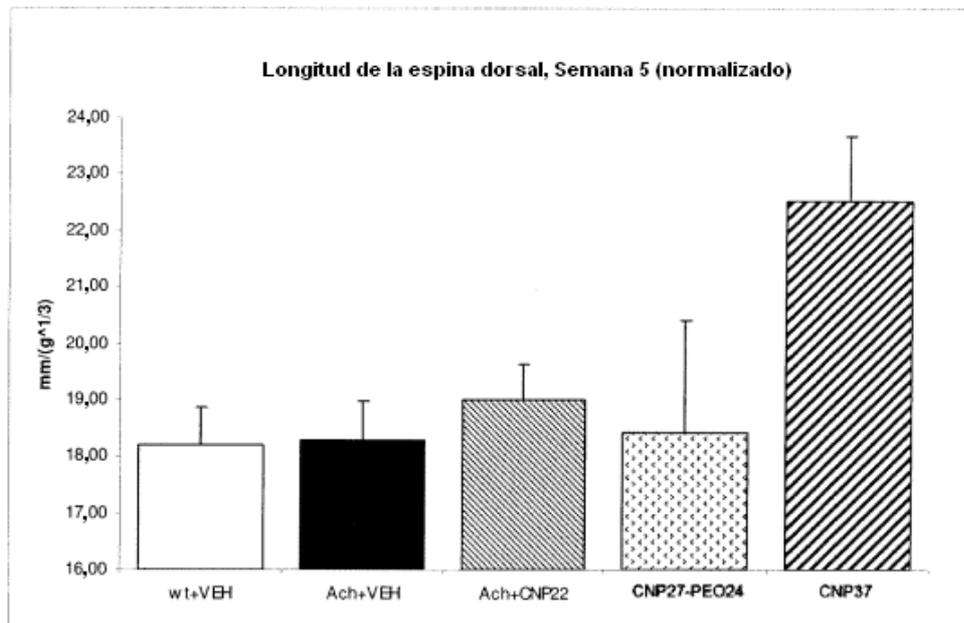


FIGURA 59

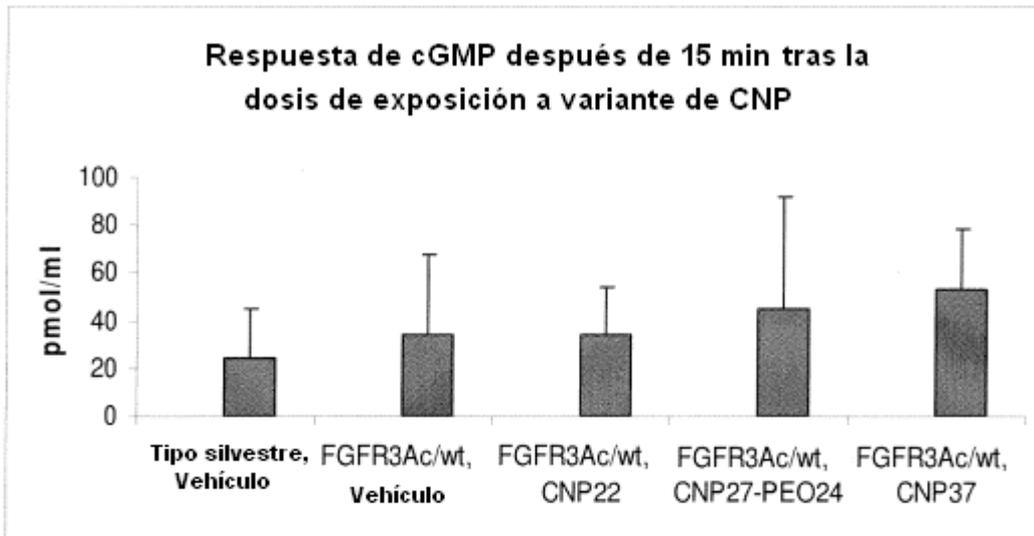


FIGURA 60

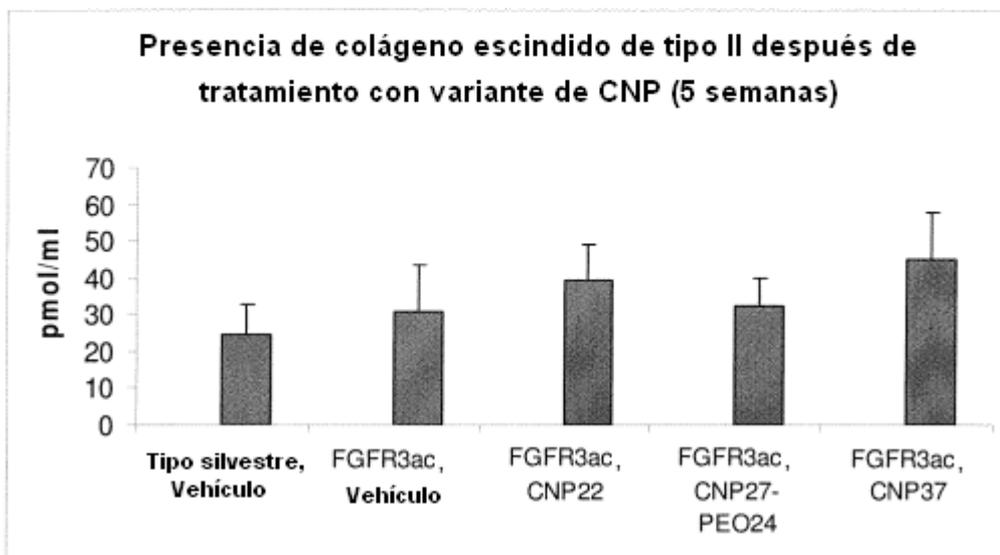


FIGURA 61

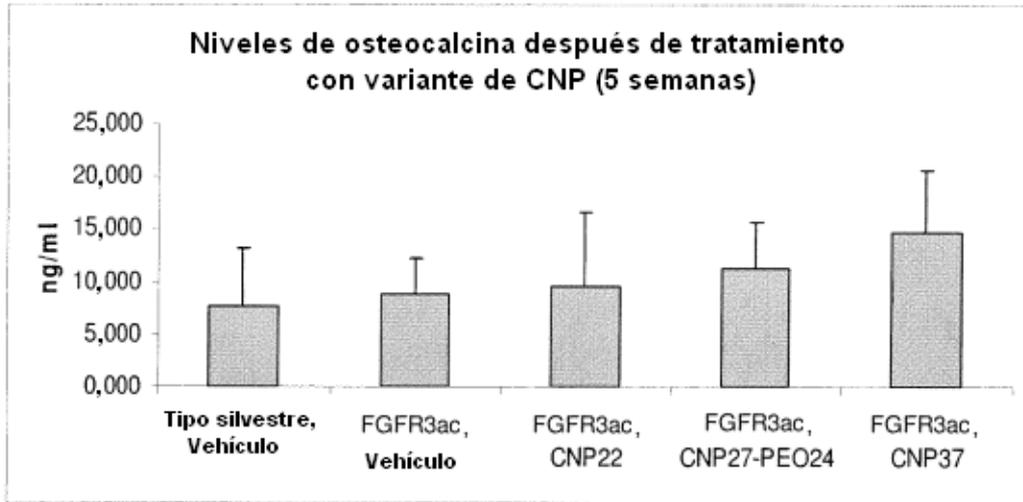


FIGURA 62

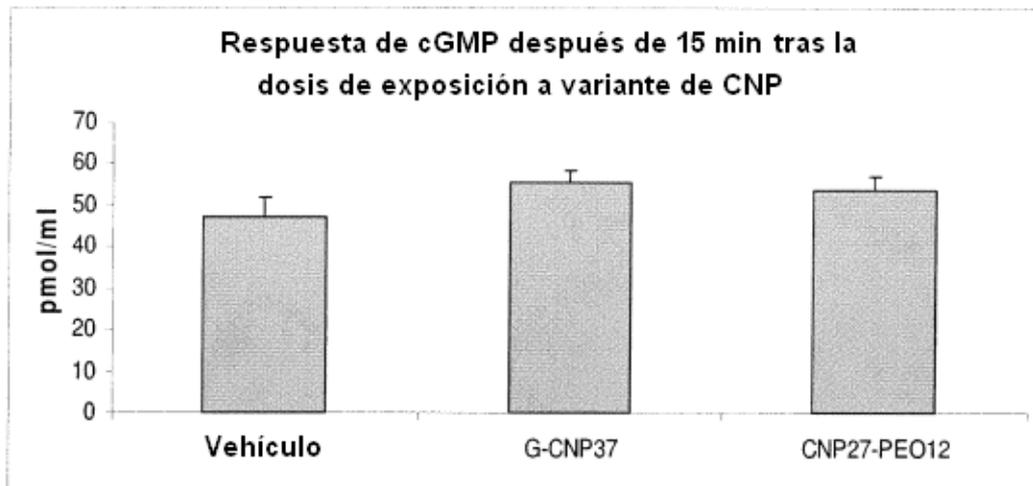


FIGURA 63

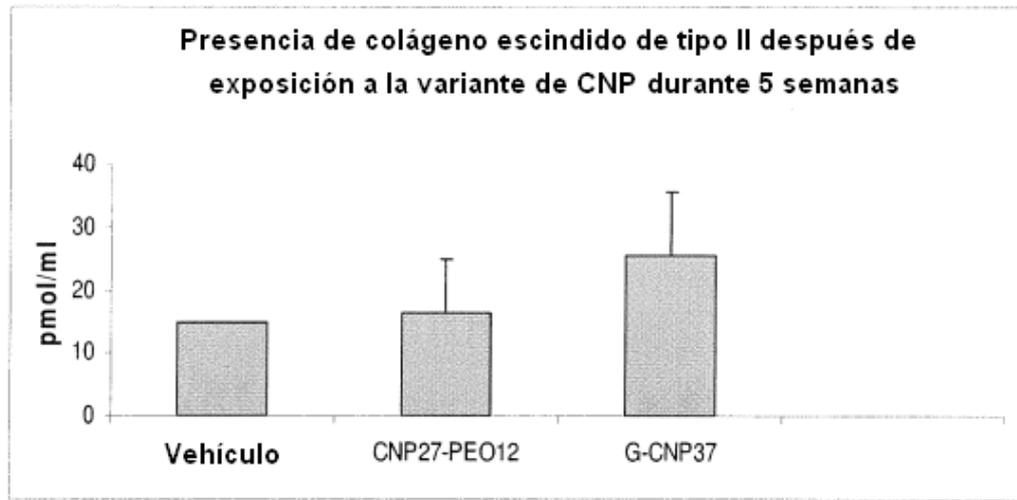
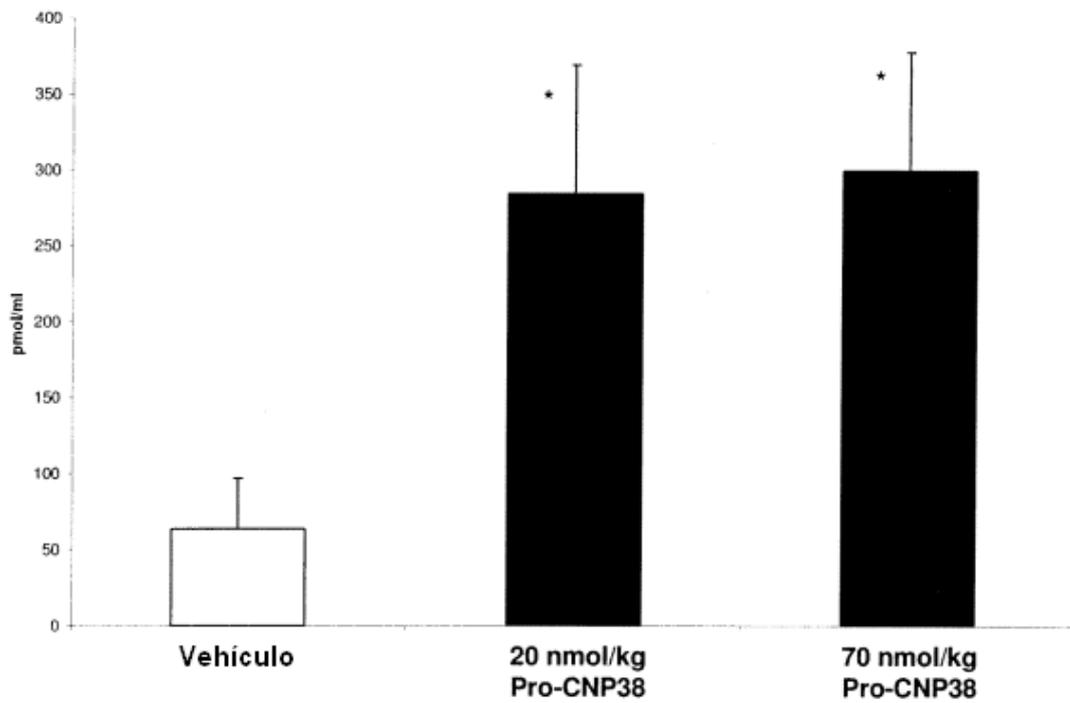


FIGURA 64

Niveles de cGMP



* $p < 0,05$

FIGURA 65

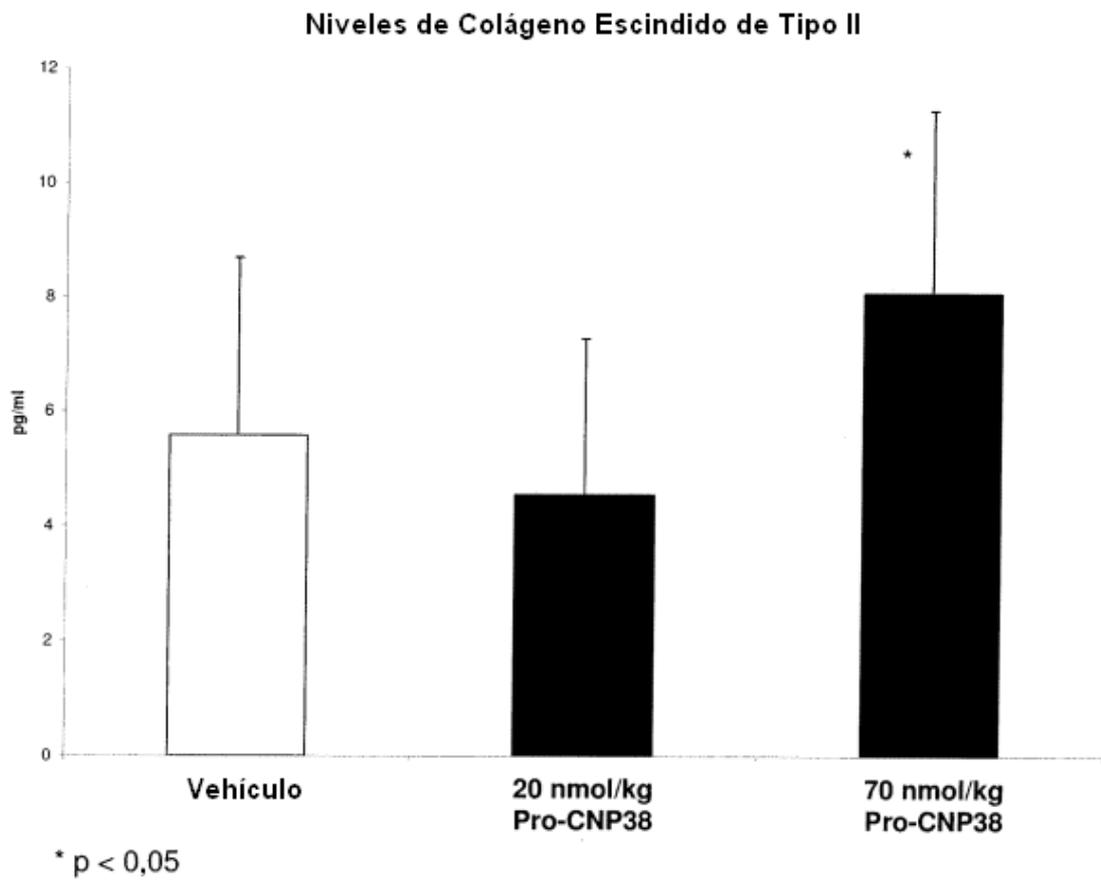


FIGURA 66

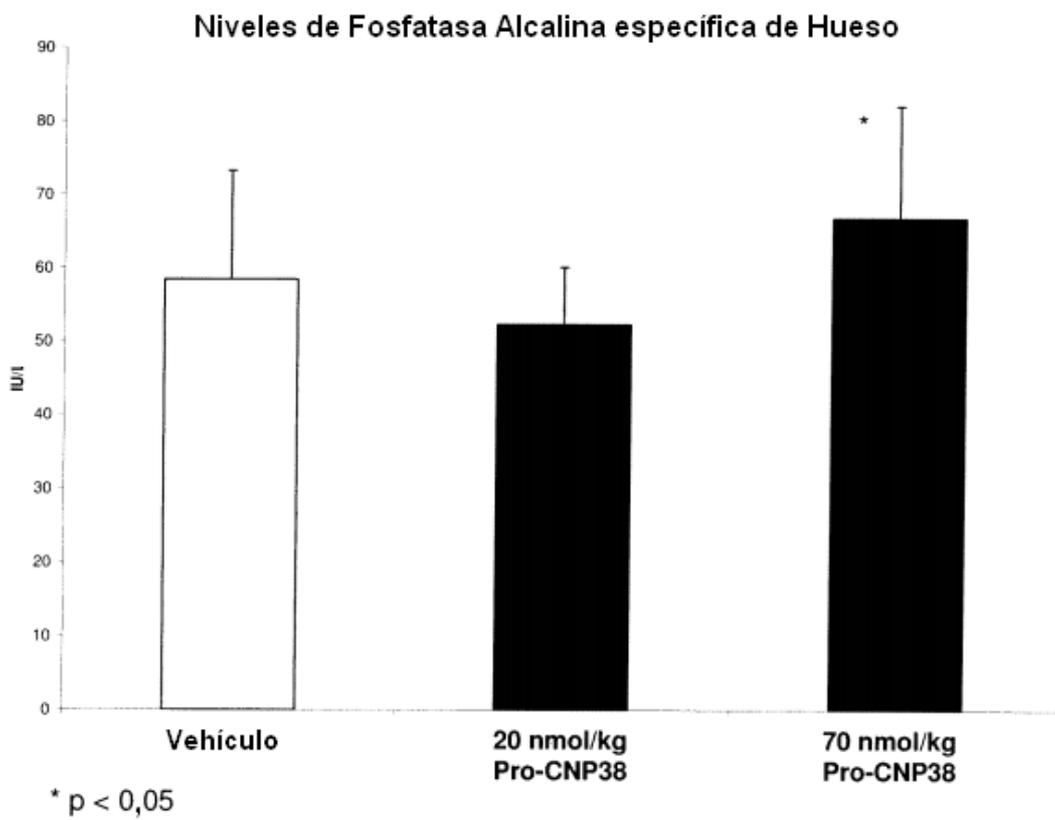


FIGURA 67

Niveles de Colágeno Escindido de Tipo II

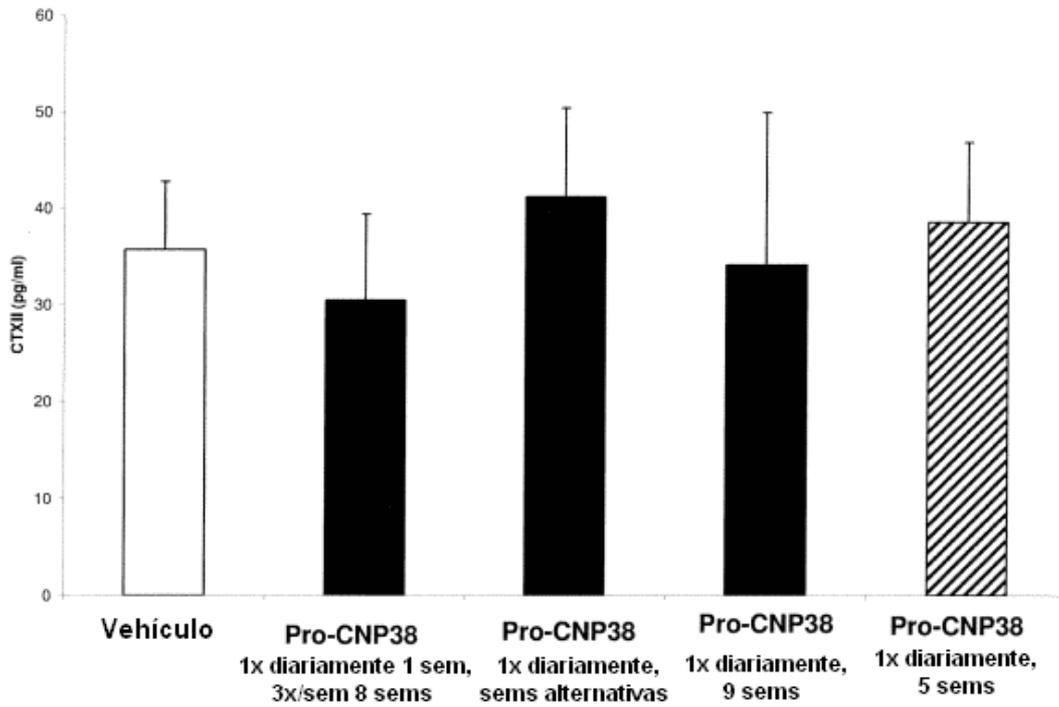


FIGURA 68

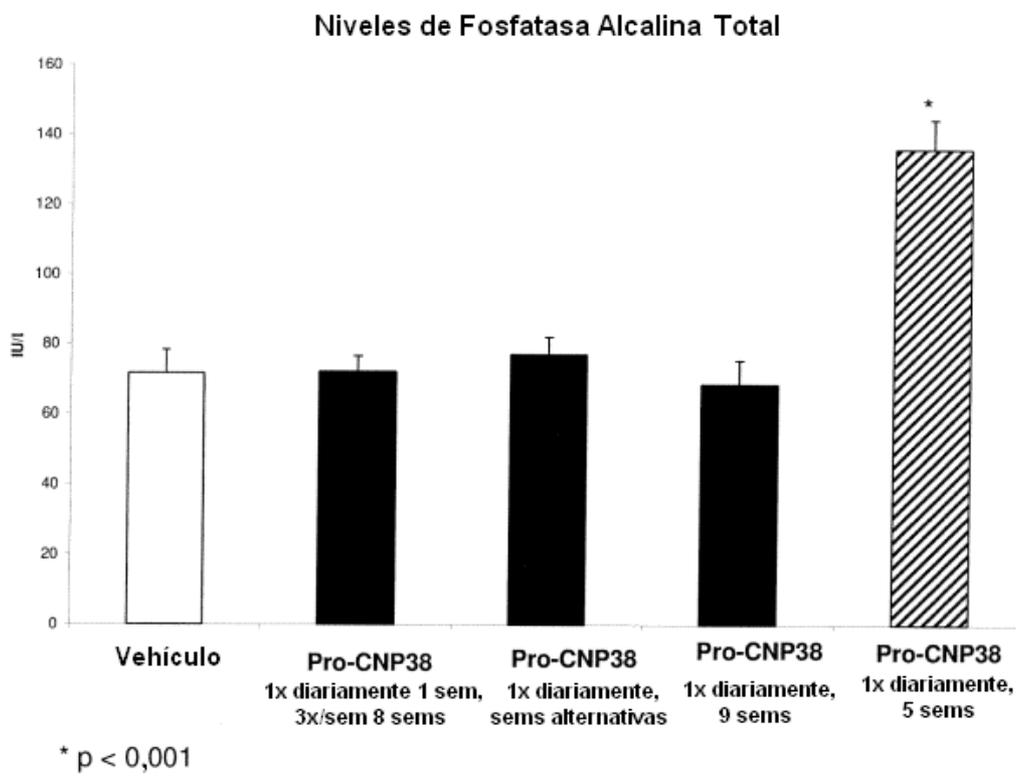


FIGURA 69

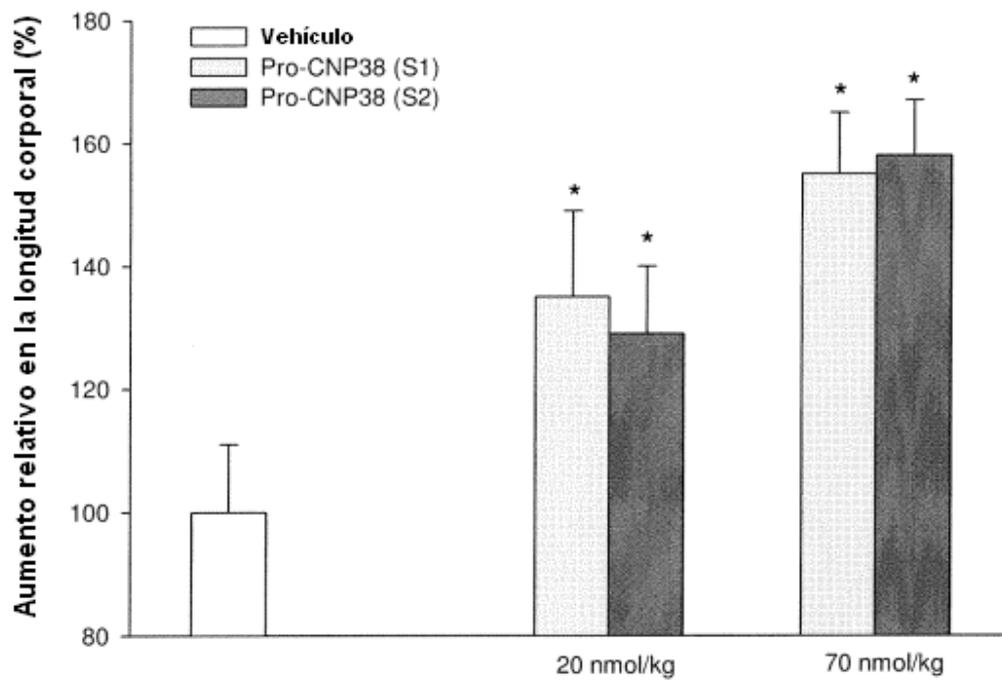


FIGURA 70

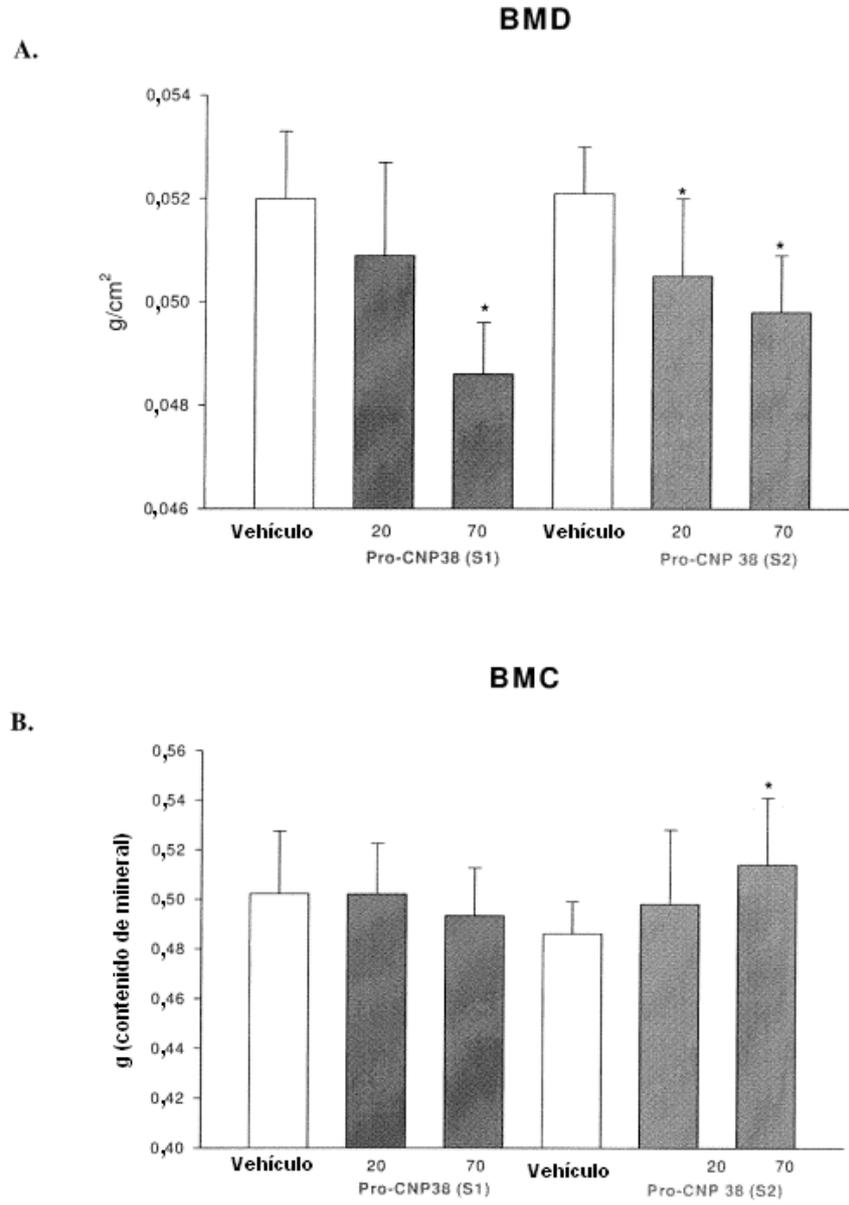


FIGURA 71

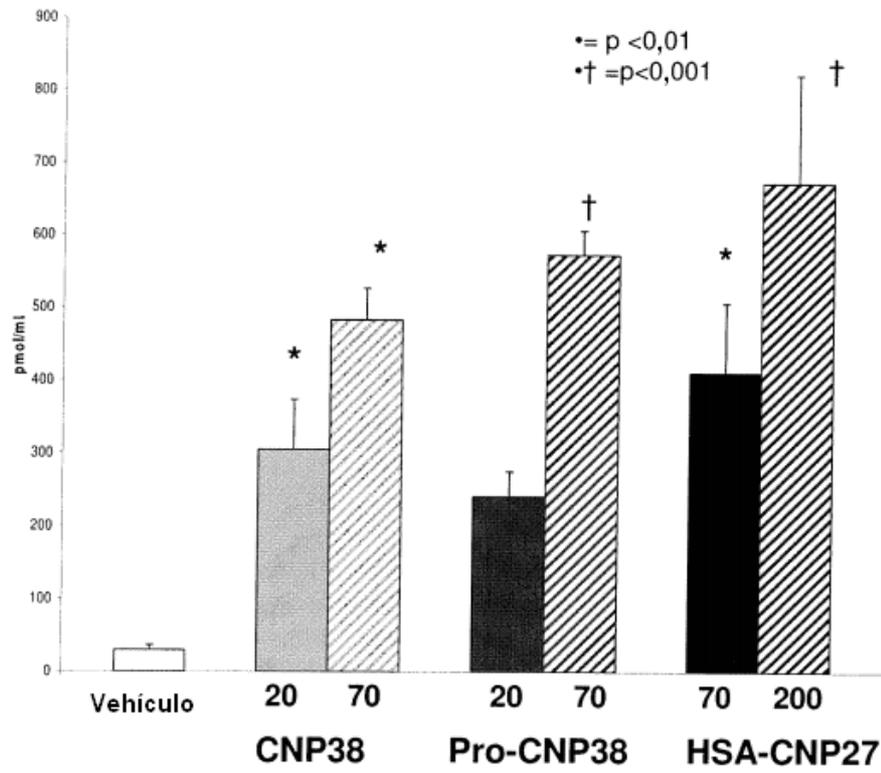


FIGURA 72

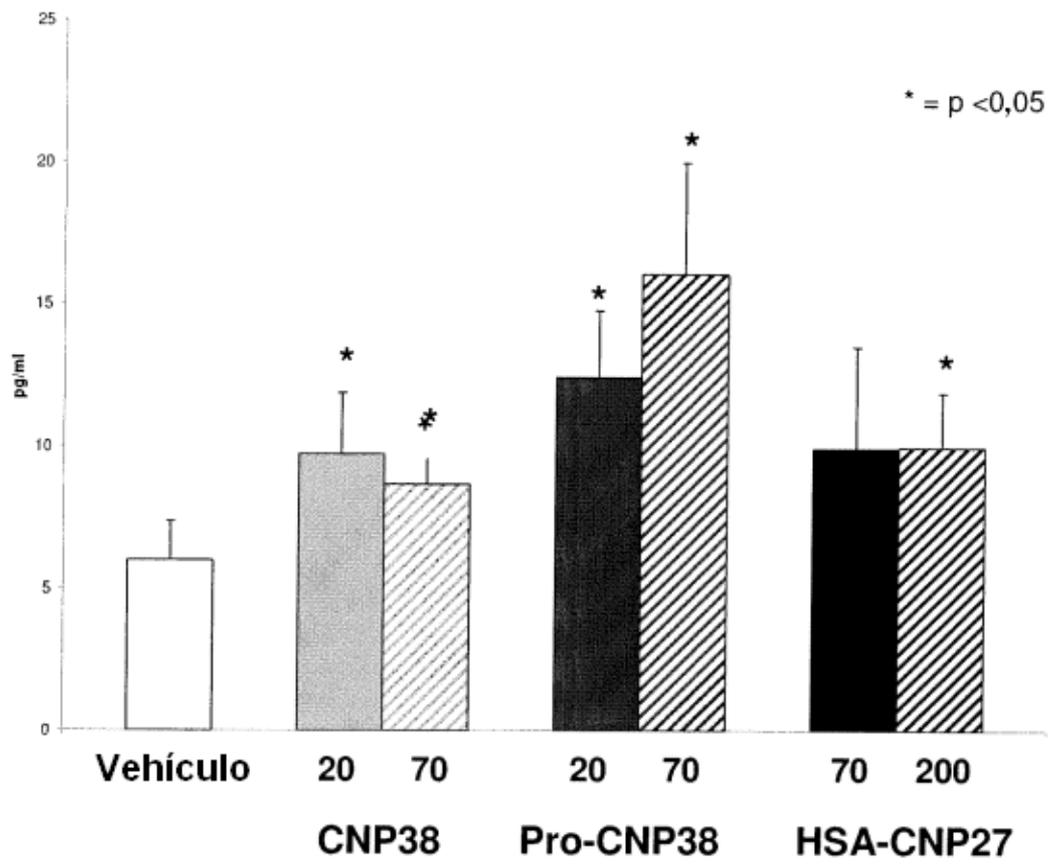


FIGURA 73

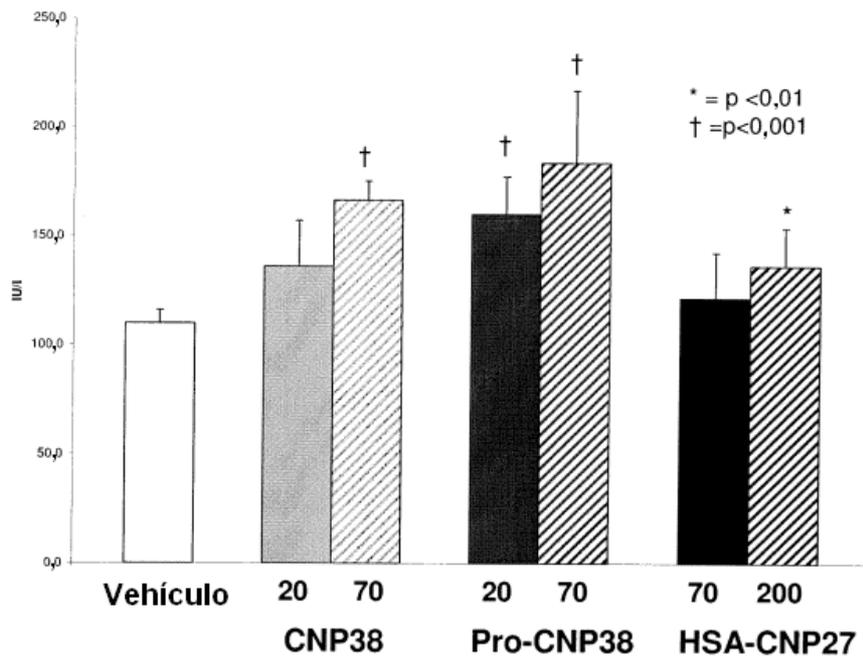


FIGURA 74

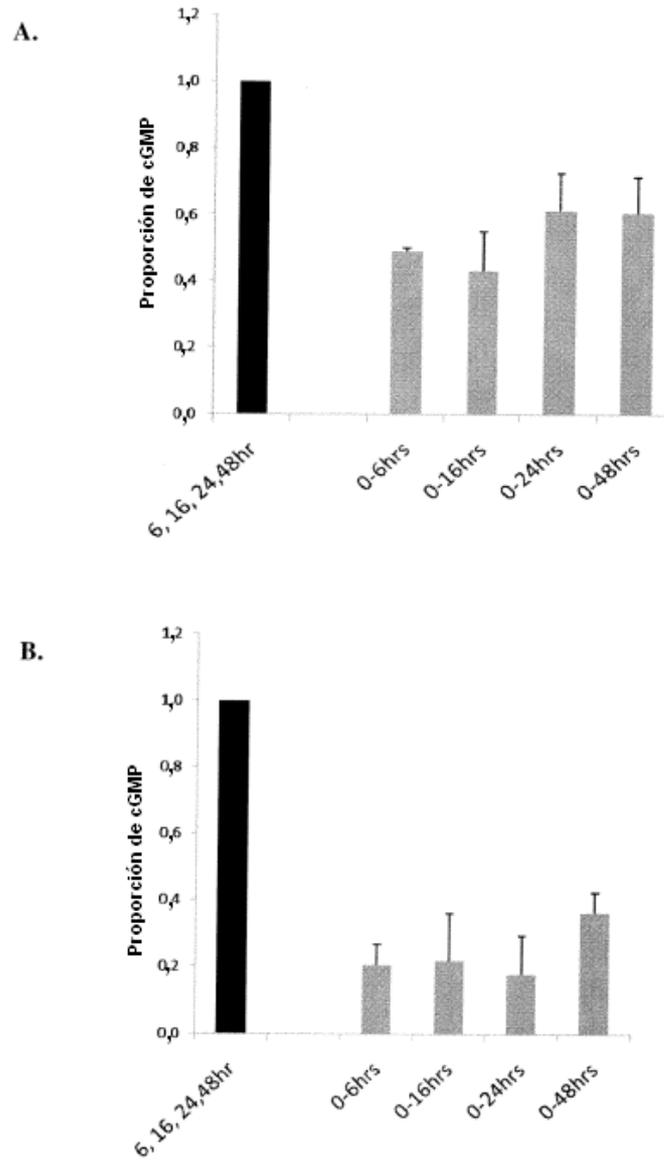
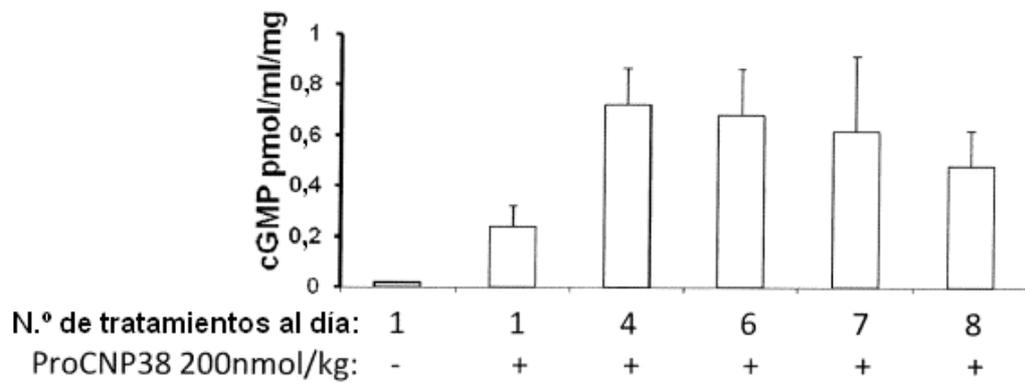


FIGURA 75

A:



B:

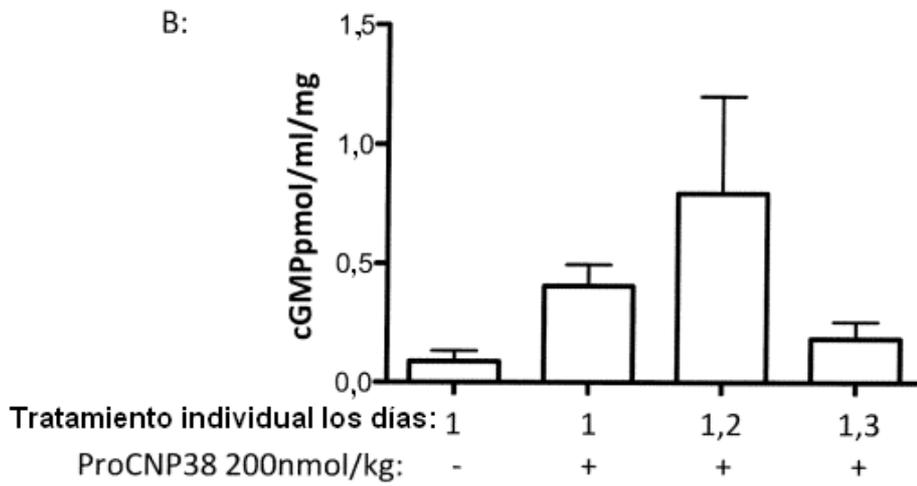


FIGURA 76

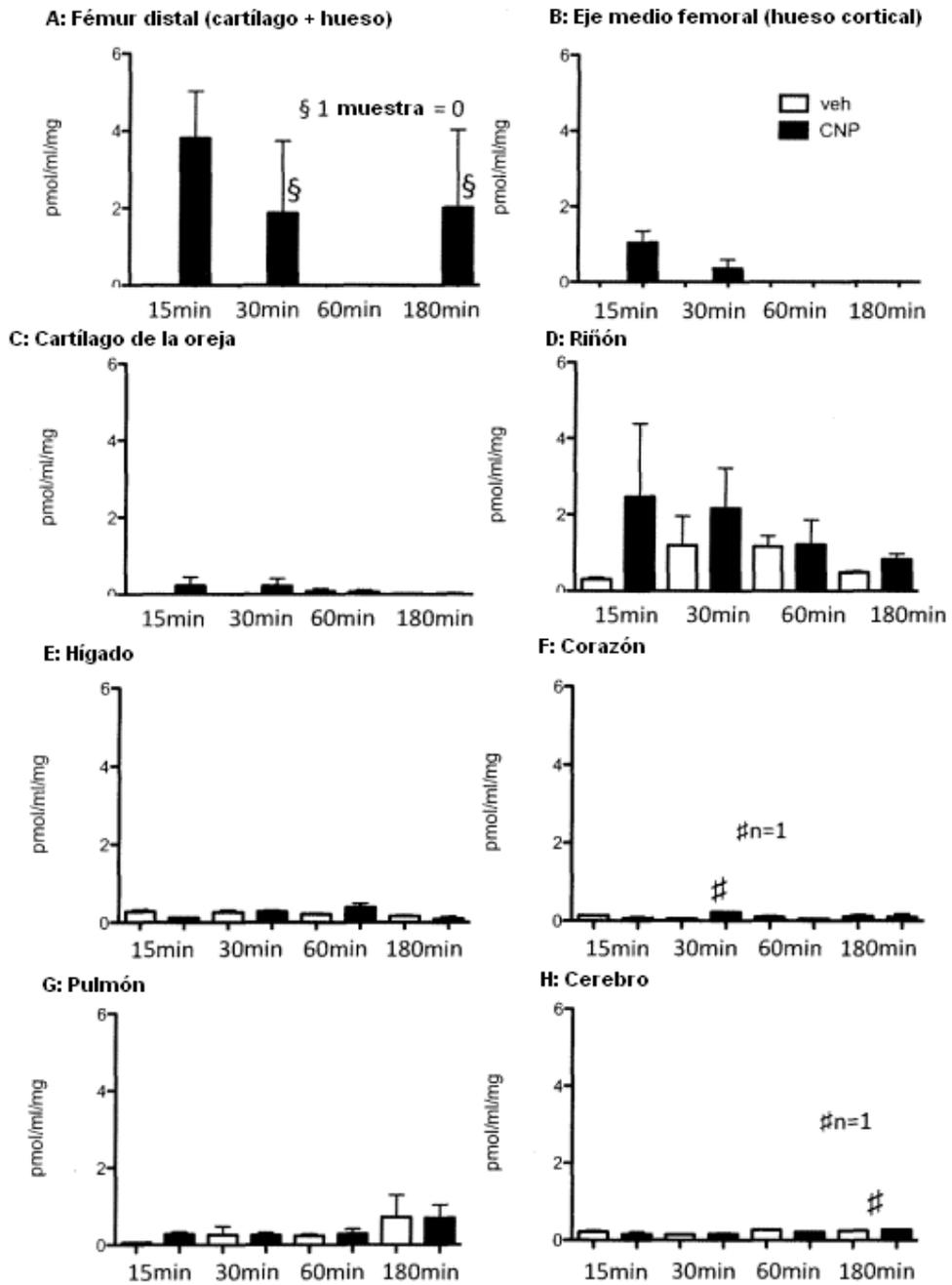


FIGURA 77

Aumento en el Ancho de la Placa de Crecimiento a partir del Valor del Estudio previo

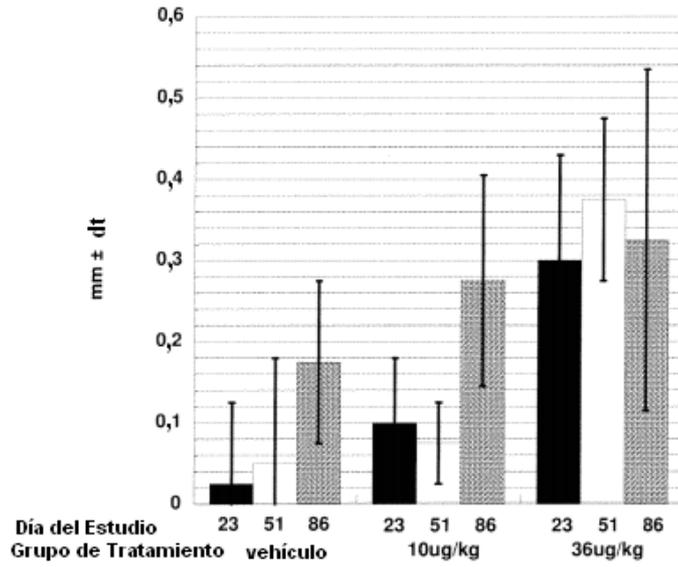


FIGURA 79

Aumento en la Longitud de la Pierna a partir del Valor del Estudio previo

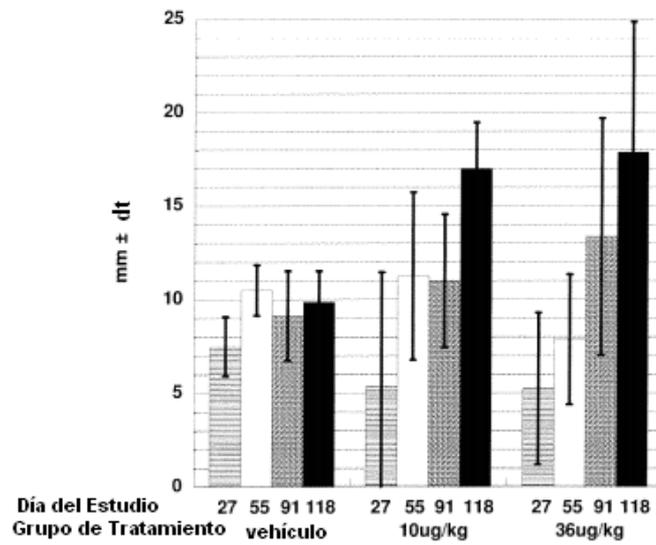
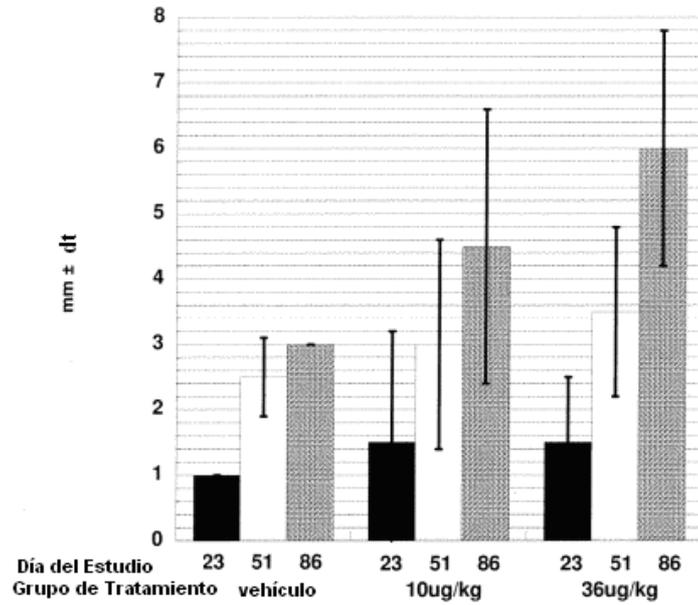


FIGURA 78

Aumento en la Longitud de la Tibia Derecha a partir del Valor del Estudio previo

A.



Aumento en la Longitud de la Tibia Izquierda a partir del Valor del Estudio previo

B.

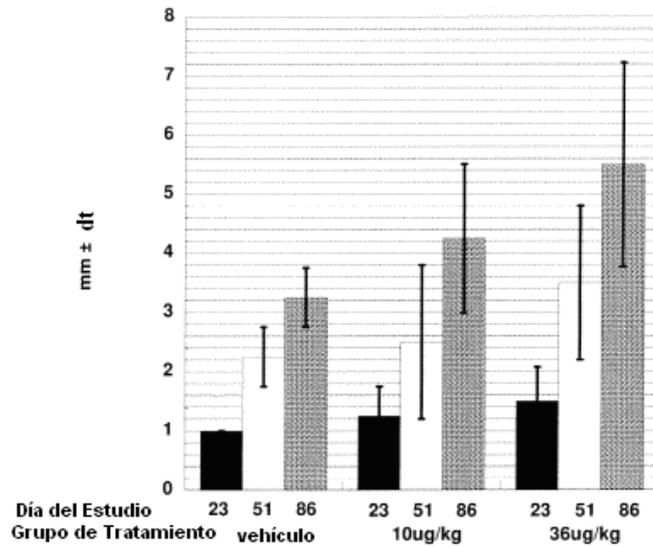


FIGURA 80

Aumento en la Longitud del Brazo a partir del Valor del Estudio previo

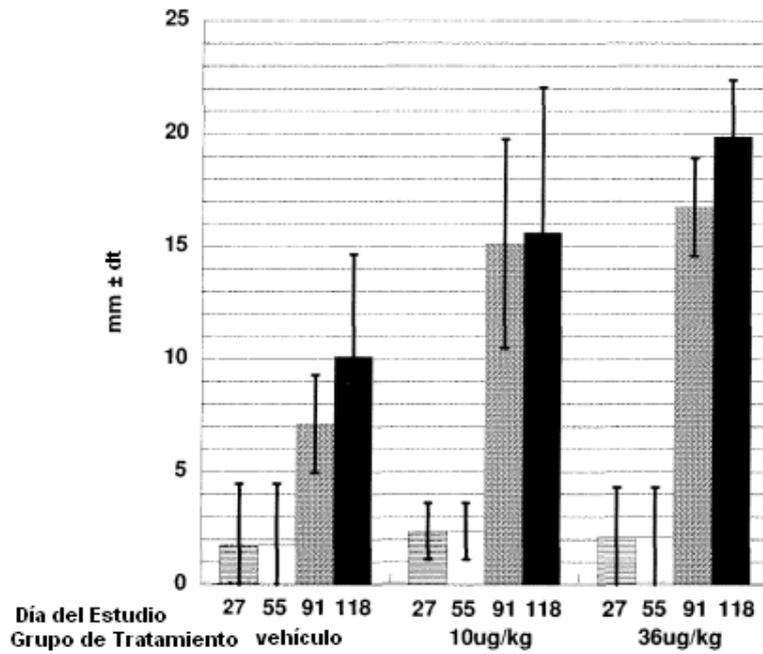


FIGURA 81

Aumento en la Longitud del Cuerpo a partir del Valor del Estudio previo

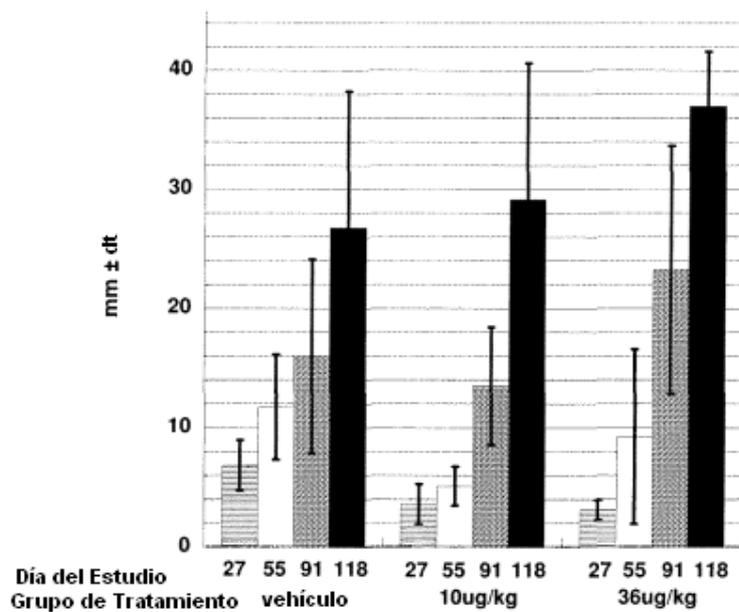


FIGURA 82

Cambio en el Nivel de Fosfatasa Alcalina en Suero

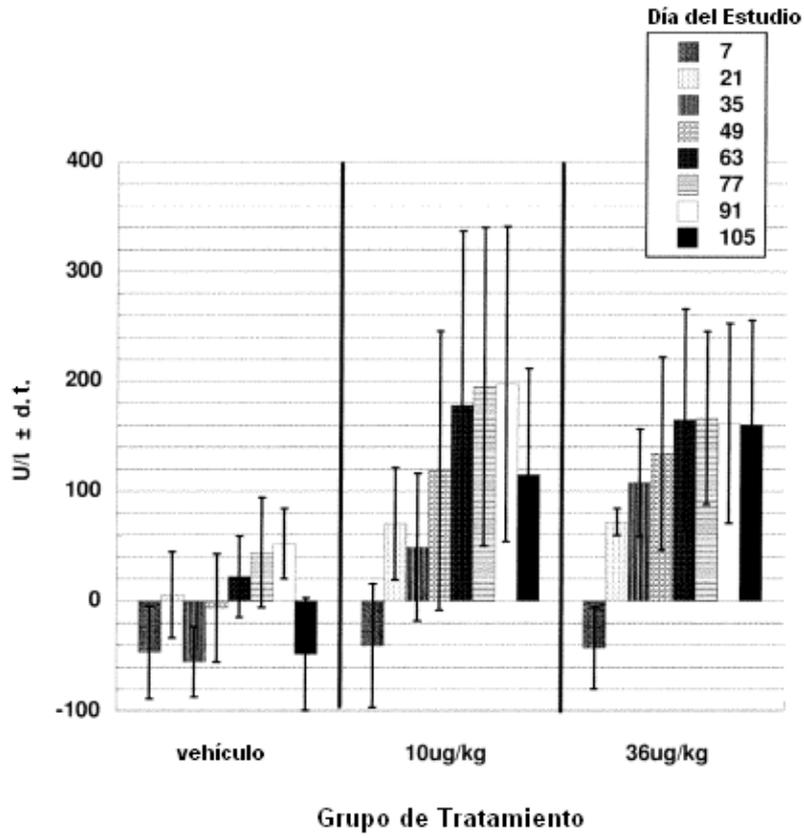


FIGURA 83

