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

**(11) PI 1012783-6 B1**

**(22) Data do Depósito:** 20/05/2010

**(45) Data de Concessão:** 21/09/2021

**(54) Título:** VARIANTES DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C (CNP), SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO RECOMBINANTE E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E COMPOSIÇÃO PARA TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DISTÚRBIO RESPONSIVO A CNP

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/00; G01N 33/53.

**(30) Prioridade Unionista:** 20/05/2009 US 61/180,112; 23/10/2009 US 61/254,563.

**(73) Titular(es):** BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC..

**(72) Inventor(es):** DANIEL J. WENDT; MIKA AOYAGI-SCHARBER; SHINONG LONG; MICHEL CLAUDE VELLARD; SIANNA CASTILLO; AUGUSTUS O. OKHAMAFE; CHRISTOPHER P. PRICE.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2010035586 de 20/05/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/135541 de 25/11/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/11/2011

**(57) Resumo:** VARIANTES DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C, SEUS USO E MÉTODO DE PRODUÇÃO RECOMBINANTE, BEM COMO COMPOSIÇÕES E CÉLULA HOSPEDEIRA. A presente invenção refere-se a variantes de peptídeo natriurético tipo C (CNP), composições farmacêuticas compreendendo variantes de CNP e métodos de fabricação de variantes de CNP. As variantes de CNP são úteis como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças responsivas a CNP, incluindo, mas não limitado a, distúrbios relacionados a osso, tais como displasias esqueletais (por exemplo, acondroplasia), e distúrbios do músculo liso vascular (por exemplo, restenose e arteriosclerose).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VARIANTES DE PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C (CNP), SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO RECOMBINANTE E SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E COMPOSIÇÃO PARA TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO OU DISTÚRBIO RESPONSIVO A CNP".**

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[001] O presente pedido reivindica a prioridade e o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 61/254.563, depositado em 23 de outubro de 2009, e do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 61/180.112, depositado em 20 de maio de 2009, cujo relatório de cada um é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

[002] O campo da invenção refere-se, em geral, a variantes de peptídeo natriurético tipo C (CNP), composições compreendendo variantes de CNP, métodos de fabricação de variantes de CNP e métodos de uso de variantes CNP para tratar distúrbios responsivos a CNP, incluindo, mas não limitado a, distúrbios relacionados a osso tais como displasias esqueléticas (por exemplo, acondroplasia) e distúrbios do músculo liso vascular.

Antecedentes da Invenção

[003] A família de peptídeo natriurético consiste em três peptídeos estruturalmente relacionados: peptídeo natriurético atrial (ANP) (No. Acesso Genbank NP_006163, para a proteína precursora de ANP, NPPA), peptídeo natriurético do cérebro (BNP) (No. de acesso GenBank NP_002512, para a proteína precursora de BNP, NPPB) e peptídeo natriurético tipo C (CNP) (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:863-870 (1990) (No. Acesso GenBank NP_077720, para a proteína precursora de CNP, NPPC) (*J. Hypertens.,* 10: 907-912 (1992)). Esses peptídeos de cadeia simples, pequenos, (ANP, BNP, CNP) têm uma estrutura de alça de 17 aminoácidos (Levin e outros, *N. Engl. J.*

*Med.,* 339: 863-870 (1998)) e têm papéis importantes em processos biológicos múltiplos. ANP e BNP se ligam a e ativam o receptor de peptídeo natriurético A (NPR-A), também chamado guanalil ciclase A (GC-A), resultando em níveis de guanosina monofosfato cíclilca intracelular maiores (cGMP). Da mesma maneira, CNP interage com NPR-B (GC-B) para estimular a geração de cGMP (*J. Hypertens*., 10: 1111-1114 (1992)). Um terceiro tipo de receptor, NPR-C, se liga a cada um dos peptídeos natriuréticos com alta afinidade e funciona principalmente para capturar os peptídeos do compartimento extracelular e depositar os peptídeos em lisossomas, onde eles são degradados (*Science*, 238: 675-678 (1987)). ANP e BNP são produzidos principalmente dentro das células musculares do coração e são acreditadas ter papéis importantes em homeostase cardiovascular (*Science*, 252: 120-123 (1991)). CNP é expresso mais amplamente, incluindo no sistema nervoso central, trato reprodutor, osso e endotélio de vasos sanguíneos (*Hypertension*, 49: 419-426 (2007)).

[004] Em humanos, CNP é inicialmente produzido a partir do gene precursor de peptídeo natriurético C (NPPC) como um pré-pró polipeptídeo de 126 aminoácidos de cadeia simples (*Biochem. Biophys. Res. Commun*., 168: 863-870 (1990)). Remoção do peptídeo de sinal dá pró-CNP, e clivagem adicional pela endoprotease furina gera um peptídeo de 53 aminoácidos ativo (CNP-53), que é *sec*retado e clivado novamente por uma enzima não conhecida para produzir o peptídeo de 22 aminoácidos maduro (CNP-22) (Wu, *J. Biol. Chem*. 278: 25847-852 (2003)). CNP-53 e NCP-22 diferem em sua distribuição, com CNP-53 predominantemente em tecidos, enquanto CNP-22 é principalmente encontrado em plasma e fluido cerebroespinhal (*J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res*., 26: 269-297 (2006)). A forma de CNP predominante em cartilagem é desconhecida. Ambos o CNP-53 e o CNP-22 se ligam similarmente à NPR-B. Ainda, ambos induzem pro-

dução de cGMP de uma maneira dependente da dose e similar (VT Yeung, *Peptides*, 17: 101-106 (1996)).

[005] Gene de CNP natural e polipeptídeo foram previamente descritos. A Patente U.S. Nº 5.352.770 revela CNP-22 isolado e purificado de cérebro de porco idêntico em sequência ao CNP humano e seu uso em tratamento de indicações cardiovasculares. A Patente U.S. Nº 6.034.231 revela gene humano e polipeptídeo de proCNP (126 aminoácidos) e o gene e polipeptídeo de CNP53 humano.

[006] Excreção de CNP a partir do espaço extracelular ocorre através da ação de endopeptidase neutra ligada à membrana (NEP), que degrada rapidamente CNP (*Biochem. J.,* 291 (Pt 1): 83-88 (1993)) e através de NPR-C, que se liga a e deposita CNP em lisossomas, onde CNP é degradado. CNP é conhecido ter uma meia-vida *in vitro* de 2,6 min no humano normal (*J. Clin. Endocrinol. Metab*. 78: 1428-35 (1994)). A concentração baixa de CNP no plasma (*J. Bone Moner. Res.,* 19 (Supl. 1) S20 (2004)) e sua co-expressão com NPR-B em vários tecidos sugere que CNP funciona principalmente através de um mecanismo autócrino/parácrino.

[007] Conforme acima declarado, CNP se liga a e ativa receptor B de peptídeo natriurético (NPR-B), também chamado guanilil ciclase B (GC-B), resultando em níveis de guanosina monofosfato cíclica intracelular maiores. Sinalização a jusante mediada por geração de cGMP influencia uma disposição diversa de processos biológicos que incluem ossificação endocondral. Desta maneira, níveis elevados ou baixos de qualquer um dos componentes neste curso podem levar a crescimento de osso aberrante. Por exemplo, inativação ou de CNP ou NPR-B em modelos de camundongo resulta em animais tendo um fenótipo com nanismo com ossos longos e vértebra mais curtos. Mutações em NPR-B humana que bloqueiam sinalização de CNP apropriada foram identificadas e resultam em nanismo (Olney, *e outros*, *J. Clin.*

*Endocrinol. Metab*. 91(4): 1229-1232 (2006); Bartels *e outros*, *Am. J. Hum. Genet*. 75: 27-34 (2004)). Em contraste, camundongos engenheirados para produzir níveis elevados de CNP mostram ossos longos e vértebra alongados.

[008] A acondroplasia é um resultado de uma mutação dominante autossomal no gene para receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 (FGFR-3), que causa uma anormalidade de formação de cartilagem. FGFR-3 normalmente tem um efeito regulador negativo sobre crescimento de condrócito e, então, crescimento de osso. Em acondroplasia, a forma mutada de FGFR-3 é constitutivamente ativa, o que leva a ossos severamente encurtados. Ambas a proliferação e a diferenciação de condrócito parecem estar perturbadas, levando à cartilagem de placa de crescimento notadamente curta (P. Krejci e outros, *J. Cell Sci.* 118: 5089-5100 (2005)). Ossificação endocondral é o processo que governa crescimento de osso longo longitudinal. Há quatro zonas de placa de crescimento – descanso, proliferativa, hipertrófica e zona de calcificação. Na placa de crescimento, NPR-B é expresso por células proliferativas enquanto NPR-C é expresso por células hipertróficas (Yamashite e outros, *J. Biochem*. 127: 177-179 (2000)). Em crescimento de osso endocondral normal, os condrócitos se organizam em colunas e proliferam na zona de proliferação da placa de crescimento. Essas colunas são desorganizadas em pacientes com acondroplasia. Ainda, a zona hipertrófica é onde as células ficam grandes e eventualmente apoptose (lise), levando à invasão de osteócito e mineralização. Os condrócitos hipertróficos e o tamanho geral da zona são muito menores em pacientes com acondroplasia do que em pacientes normais. CNP é uma agonista para NPR-B, um regulador positivo para condrócito e crescimento de osso. Sinalização a jusante de CNP/NPR-B inibe o curso de FGFR-3 no nível de proteína cinase ativada por mitógeno (MAP K). Inibição em MAP K promove proliferação e diferenci-

ação dos condrócitos nas zonas proliferativa e hipertrófica da placa de crescimento, resultando em crescimento de osso.

[009] Em humanos, ativação de mutações de FGFR-3 são a principal causa de nanismo genético. Camundongos tendo FGFR-3 ativado servem como um modelo de acondroplasia, a forma mais comum de displasias esqueléticas, e superexpressão de CNP resgata esses animais de nanismo. Desta maneira, CNP e variantes funcionais de CNP são agentes terapêuticos potenciais para tratamento das várias displasias esqueléticas.

[010] Uso terapêutico de CNP está atualmente limitado por sua meia-vida curta no plasma, a qual foi mostrada ser de 2,6 minutos *in vivo* em humanos (*J. Clin. Endocrinol. Metab*., 78: 1428-35 (1994)). Para aumentar a concentração de CNP acima de níveis intrín*sec*os (cerca de 5 pM) tipicamente encontrados em plasma humano, infusão contínua tem sido necessária em todos os estudos humanos e animais usando CNP sistemicamente administrado. Uma variante de CNP tendo uma meia-vida no soro mais longa e exibindo atividade similar ou aperfeiçoada àquela de CNP do tipo selvagem é importante para uma estratégia terapêutica sustentável. Dois mecanismos através dos quais a meia-vida de CNP é reduzida em plasma humano são degradação por endopeptidase neutral (NEP) e excreção pelo receptor de peptídeo natriurético C (NPR-C) (*Growth Horm. & IGF Res*., 16: S6-S14 (2006)). Modificações de peptídeos podem supostamente melhorar resistência à clivagem por endopeptidase e exopeptidase (*Amino Acids,* 30: 351-367 (2006); *Curr. Opin. Biotech*., 17: 638-642 (2006)).

[011] As atividades biológicas de vários análogos e derivados de CNP foram avaliadas. Ao substituir S-metila Cys no lugar de ambos $Cys_6$ e $Cys_{22}$, ciclização do peptídeo através de uma ligação dissulfeto $Cys_6$-$Cys_{22}$ foi supostamente mostrada ser importante para a atividade de CNP em estimulação de formação de cGMP (*Biochem. Biophys.*

*Res. Comm*., 183: 964-969 (1992), também usando varredura de alanina para identificar aminoácidos importantes para funcionalidade de CNP). Um aumento adicional significante de atividade supostamente resultou da presença combinada dos aminoácidos Leu9, Lys10 e Leu11. A Patente U.S. Nº 5.434.133 descreve análogos de CNP compreendendo CNP-22 com substituições na posição de aminoácido 6, 7, 9, 11 ou 22, onde o aminoácido é selecionado de Cys ou Pmp (ácido pentaciclomercaptopropiônico) na posição 6, Phe, 4-cloro-Phe, 4-flúor-Phe, 4-nitro-Phe ou Cha (3-cicloexil-Ala) na posição 7, Gly, Val, Aib ou tLeu na posição 9, Leu ou Ile na posição 11 e Cys ou PmP na posição 22.

[012] A Publicação de patente U.S. Nº 2004/0138134 (agora Patente U.S. Nº 7.276.481) descreve variantes de CNP compreendendo os aminoácidos $Cys_6$ a $Cys_{22}$ de CNP-22 ("CNP-17") que inclui pelo menos um substituinte para outro aminoácido natural na posição 9, 10, 11, 16, 17, 19 ou 20, variantes de CNP com inserções e deleções, tal como adição de um resíduo His no sítio primário relatado de clivagem de NEP, entre $Cys_6$ e $Phe_7$, e métodos de uso de tais variantes para aumento do tamanho de uma placa de crescimento ósseo em osso anormal e alongamento de um osso anormal. No entanto, quaisquer ganhos significantes em atividade conforme medido através de produção de cGMP foram obtidos para essas variantes, e a atividade foi diminuída para quase todos as variantes, conforme observado em um método baseado em célula *in vitro* (Exemplo 7). Ainda quaisquer dados de apoio, tal como, por exemplo, estabilidade *in vitro* ou determinação *in vivo* de farmacocinética aperfeiçoada (PK) (*Pharmacokinetics*), foram providos para substanciar a resistência a NEP e resistência a NPR-C declaradas dos análogos de CNP. A Patente U.S. Nº 6.743.425 revela substâncias para tratamento de acondroplasia que ativam NPR-B/GC-B e são peptídeos ou compostos de peso molecular

baixo, incluindo os peptídeos natriuréticos tipo C CNP-22 e CNP-53. A Publicação PCT Nº WO 94/20534 revela uma quimera de CNP-22 e o terminal C de 5 aminoácidos de ANP chamado peptídeo vasonatrina (VNP), um número limitado de substituições de aminoácido e peptídeos quiméricos cíclicos que resulta da formação de uma ligação dissulfeto ou dupla.

[013] Abordagens para melhora da meia-vida de outros membros da família de peptídeo natriurético incluem diminuição da afinidade de ANP para NPR-C (Patente U.S. Nº 5.846.932), utilizando antagonistas de pentapeptídeo de NPR-C (WO 00/61631) e co-administração de inibidores de NEP tais como tiorpan e candoxatril (*Clin. Exp. Pharma. Physiol*., 25: 986-991 (1997), *Hyperten*., 30: 184-190 (1997)). O WO 2004/047871 descreve conjugados de BNP e variantes de BNP para porções de polialquileno glicol, porções de açúcar, porções de polisorbato, porções policatiônicas e outras porções de polímero hidrofílico que supostamente exibem meia-vida aperfeiçoada em circulação e supostamente são úteis para o tratamento de falência cardíaca congestiva aguda.

[014] Não há quaisquer trabalhos publicados, no entanto, sobre uma estratégia bem sucedida para fabricação de CNP resistente à NEP enquanto retendo sua funcionalidade.

Sumário da Invenção

[015] A presente invenção refere-se a variantes de peptídeo natriurético tipo C (CNP) que são úteis no tratamento de distúrbios relacionados a osso (por exemplo, acondroplasia) e distúrbios de músculo liso vascular. A invenção compreende variantes de CNP tendo meia-vida no soro aumentada, por exemplo, como um resultado de habilidade reduzida em se ligar à endopeptidase neutral (NEP), resistência maior à proteólise por NEP e/ou afinidade reduzida para o receptor de peptídeo natriurético de excreção C (NPR-C), enquanto retendo a fun-

cionalidade de CNP.

[016] A sequência do tipo selvagem de CNP-22 humana (referida aqui como "hCNP22", "wtCNP22" ou "CNP22") é mostrada abaixo:

[017] (terminal N) $Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$Lys_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$Lys_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$ (SEQ ID Nº: 1).

[018] As posições 6 a 22 de CNP22 formam um domínio cíclico por meio de uma ligação dissulfeto entre Cys6 e Cys22. A estrutura cíclica de 17 aminoácidos foi mostrada ser importante para ligação de CNP a NPR-B (Schiller, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 138: 880-886 (1986)). A sequência de aminoácido das posições 6 a 22 de CNP22 é referida aqui como "CNP17" (SEQ ID Nº:2).

[019] CNP é suscetível à clivagem por NEP em vários sítios: Cys6-Phe7, Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17 e Gly19-Leu20. Em uma modalidade, a invenção compreende uma variante de CNP que é (1) modificada para aumentar seu tamanho geral ou peso molecular, por exemplo, para uma faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 4 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 5 kDa, 5,2 kDa, 5,4 kDa, 5,6 kDa, 5,8 kDa, 6 kDa, 6,2 kDa, 6,4 kDa, ou a cerca de 7 kDa, 7,2 kDa ou cerca de 8,2 kDa e/ou (2) modificada em certas posições de aminoácido para reduzir sua susceptibidade à clivagem por NEP em 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 de todos os sítios listados acima. O tamanho ou o peso molecular da variante de CNP pode ser aumentado através de vários meios, por exemplo, através da conjugação de aminoácidos adicionados e/ou outros tipos de grupos químicos (por exemplo, polímeros naturais ou sintéticos) à sequência de peptídeo, por exemplo, o terminal N, o terminal C e/ou cadeia(s) lateral(ais), e/ou usando aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais e/ou peptidomiméticos com cadeias laterais mais volumosas. A variante de CNP é opcionalmente conjugada mais a outras porções

funcionais ou estruturais. Opcionalmente em combinação com qualquer uma das modalidades descritas aqui, mutação(ões) (por exemplo, substituição(ões), adição(ões) ou deleção(ões)) podem ser introduzidas em certas posições de CNP22 para reduzir a afinidade das variantes de CNP para NPR-C. Modificações adicionais podem ser feitas sem afetar a resistência à NEP ou atividade de CNP, por exemplo, substituições conservativas, ou outras modificações conhecidas na técnica.

[020] Em uma modalidade, a variante de CNP é representada pela fórmula geral:

[021] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$Lys_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$Lys_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 5), onde:

[022] a variante de CNP compreende um ou mais aminoácidos modificados, os quais podem resultar em ligações de peptídeo modificadas (por exemplo, através do uso de isósteres ligados a peptídeo), em uma posição correspondendo a um ou mais dos resíduos de CNP que seguem: Gly1, Lys4, Gly5, Cys6, Phe7, Gly8, Leu9, Lys10, Leu11, Ile14, Gly15, Ser16, Met17, Gly19, Leu20 e Gly21; e

[023] (x) e (z) independentemente podem estar ausentes ou podem ser uma sequência de aminoácido derivada de um polipeptídeo natriurético (por exemplo, NPPC, ANP, BNP) ou um peptídeo não natriurético (por exemplo, albumina do soro humano) (HSA), IgG, etc).

[024] Em uma modalidade, a variante de CPN inclui: (1) uma modificação em uma posição de aminoácido correspondendo a uma das posições 6, 7 ou 8 (Cys6, Phe7 ou Gly8) de CNP22, (2) opcionalmente deleção, adição e/ou substituição de qualquer um dos aminoácidos nas posições 1-5 (Gly1, Leu2, Ser3, Lys4 e GLy5) e (3) opcionalmente até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 modificações adicionais (deleções, adições e/ou substituições) nas posições correspondendo às posições

6-22, das quais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 podem ser substituições conservativas ou outras substituições descritas aqui ou conhecidas na técnica.

[025] É compreendido que uma referência a uma posição de aminoácido particular pelo número (por exemplo, posição 7 de CNP22) refere-se à posição de aminoácido correspondente em qualquer variante de CNP, mesmo se o número da posição naquela variante de CNP tiver mudado devido a inserções ou deleções precedentes. Por exemplo, uma referência à "posição 7" ou "Phe7" significaria a posição correspondente 2 para uma variante de CNP onde os primeiros cinco aminoácidos tinham sido deletados. Similarmente, uma referência à "posição 7" significaria a posição correspondente 8 para uma variante de CNP onde um aminoácido tinha sido adicionado ao terminal N.

[026] Em qualquer uma das modalidades descritas aqui, a variante de CNP pode ser ciclizada através de uma ligação covalente entre as posições correspondendo a 6 e 22 de CNP22. É compreendido que a ligação covalente é formada usando quaisquer métodos conhecidos na técnica. Em outra modalidade, a variante de CNP pode ser ciclizada através de uma ligação covalente formada entre um aminoácido ou em direção ao terminal N de um aminoácido ou em direção ao terminal C (referidos como "aminoácidos" terminais para este propósito) do peptídeo. Em uma modalidade, a ligação covalente é formada entre as cadeias laterais dos dois aminoácidos terminais ou os aminoácidos nas posições correspondendo a 6 e 22 de CNP22. Em outra modalidade, a ligação covalente é formada entre a cadeia lateral de um aminoácido terminal e o grupo terminal do outro aminoácido terminal ou entre os grupos terminais de cada aminoácido terminal. Por exemplo, ligações, cabeça-para-cauda, cadeia lateral-para-cadeia lateral, cadeia lateral-para-cabeça ou cadeia lateral-para-cauda são possíveis para a ligação covalente formada entre os aminoácidos terminais ou entre os

aminoácidos nas posições correspondendo a 6 e 22 de CNP22.

[027] Em uma modalidade, a invenção provê uma variante de CNP tendo afinidade reduzida para NEP e/ou resistência maior para clivagem por NEP e/ou meia-vida no soro aumentada *in vivo*, enquanto retendo a funcionalidade de CNP (por exemplo, estimulação de produção de cGMP). NEP reconhece preferivelmente substratos menores do que cerca de 3 kDa, devido ao tamanho limitado de sua poço de sítio ativo (Oefner, *J. Mol. Biol*., 296: 341-349 (2000)). Em uma modalidade, as variantes de CNP são modificadas para aumentar seu peso molecular geral para uma faixa de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 4, 4,6, 5, 5,2, 5,8, 6, 6,4 ou 7 kDa, por exemplo, através da adição de cerca de 0,6 a cerca de 5 kDa de aminoácidos, polímeros hidrofílicos ou solúveis em água, ácidos hidrofóbicos (incluindo ácidos graxos) e/ou carboidratos. Em modalidades exemplares específicas, as variantes de CNP têm um peso molecular entre cerca de 2,6 kDa e cerca de 7 kDa ou entre cerca de 2,8 kDa e 6 kDa ou entre cerca de 2,8 kDa e cerca de 5,8 kDa. Em certas modalidades, pelo menos cerca de 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6 ou 1,8 kDa ou até 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 ou 5 kDa são adicionados, para aumentar o peso molecular total da variante de CNP, por exemplo, para uma faixa de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa até cerca de 4 kDa, 4,2 kDa, 4,4 kDa, 4,6 kDa, 4,8 kDa, 5 kDa, 5,2 kDa, 5,4 kDa, 5,6 kDa, 5,8 kDa, 6 kDa, 6,2 kDa, 7,2 kDa, 8,2 kDa ou mais. Em algumas modalidades, tais variantes de CNP compreendem uma sequência de aminoácido pelo menos cerca de 70%, 75%. 80%, 85%, 90% ou 95% idêntica ou homóloga aos aminoácidos 6-22 de CNP22. Em outras modalidades, tais variantes de CNP compreendem uma substituição, inserção ou deleção de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 aminoácidos com outro aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético. Embora ambas as substituições ou inserções conservativas e não conservativas sejam

pretendidas em qualquer posição, introdução de modificações podem começar, por exemplo, através de substituições conservativas em regiões que foram identificadas na técnica como envolvidas em atividade de CNP ou ligação de NPR-B, enquanto substituições não conservativas podem ser feitas naquelas regiões que foram previamente mostradas ser tolerantes à modificação.

[028] Em outra modalidade, as variantes de CNP compreendem um CNP tendo uma porção ciclizada intacta entre Cys 6 e Cys22 e caudas N-terminais e/ou C-terminais que contêm cerca de 1-40, 1-20, 5-40, 5-35, 10-35, 15-35, 5-31, 10-31 ou 15-31 aminoácidos e fragmentos derivados de um polipeptídeo CNP e/ou um polipeptídeo não CNP. Em uma modalidade, tais variantes de CNP têm um peso molecular em uma faixa de a partir de cerca de 2,8 kDa a cerca de 4, 4,6, 5, 5,2, 5,8, 6, 6,4 ou 7 kDa. Exemplos não limitantes de tais variantes de CNP incluem CNP22 do tipo selvagem ou CNP22 com uma ou mais substituições de aminoácido (por exemplo, uma substituição K4R), tendo uma extensão N-terminal e/ou C-terminal derivada de sequências precursoras de peptídeo natriurético (por exemplo, ANP, BNP ou CNP) de humano ou outra espécie, uma variante do precursor de peptídeo natriurético C (NPPC) com substituições, adições e/ou deleções de aminoácido (por exemplo, as variantes de CNP podem ser truncamentos de CNP-53 que resultam em peptídeos com um peso molecular entre cerca de 2,8 kDa e 5,8 kDa) ou outros polipeptídeos não CNP tais como, por exemplo, albumina do soro ou proteína IgG (por exemplo, as variantes de CNP podem ser quimeras de CNP contendo fragmentos de albumina do soro ou IgG de humano ou outra espécie).

[029] Em uma modalidade, variantes de CNP tendo uma massa total caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, projetadas para resistência aumentada à degradação por NEP, são represen-

tadas pela fórmula geral:

[030] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-(b)$_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-(h)$_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 6), onde:

[031] (x) é um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é polietileno glicol (PEG, também chamado óxido de polietileno (PEO)), e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido contendo de a partir de 1 a 35 aminoácidos e derivada de NPPC ou suas variantes com substituições e/ou deleções, ANP, BNP ou outros (poli)peptídeos não CNP tais como, por exemplo, albumina do soro, IgG, glicoproteínas ricas em histidina, fibronectina, fibrinogênio, polipeptídeos contendo dedo de zinco, osteocrina ou fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2);

[032] (z) pode estar ausente ou pode ser um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é PEG, e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido derivada de um polipeptídeo natriurético (por exemplo, NPPC, CNP, ANP ou BNP) ou polipeptídeo não natriurético (por exemplo, albumina do soro ou IgG); e

[033] (b) e (h) independentemente podem ser cada um o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou qualquer aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não tenha uma amina primária reativa em uma cadeia lateral incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu ou Ser. Em uma modalidade (b) é Arg. Em outra modalidade, para resistência à NEP aperfeiçoada, (b) não é Gly. Em ainda outra modalidade, (h) não é Arg.

[034] Exemplos não limitantes de sequência de aminoácido deri-

vada de NPPC ou suas variantes incluem:

[035] Arg,

[036] Glu-Arg,

[037] Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID Nº:7),

[038] Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID Nº: 8),

[039] Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (SEQ ID Nº: 9),

[040] Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (SEQ ID Nº: 10),

[041] Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (SEQ ID Nº: 11),

[042] Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (SEQ ID Nº: 12),

[043] Gly-Ala-Asn-Arg-Met (SEQ ID Nº: 13),

[044] Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (SEQ ID Nº: 14),

[045] Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (SEQ ID Nº: 15),

[046] 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),

[047] Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (SEQ ID Nº: 18),

[048] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID Nº: 19),

[049] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg, (SEQ ID Nº: 20)

[050] 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), e

[051] 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).

[052] Exemplos não limitantes de sequências de aminoácido derivadas de polipeptídeos não CNP tais como, por exemplo, ANP, BNP, albumina do soro e IgG incluem:

[053] Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (SEQ ID Nº: 23);

[054] Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID Nº: 24);

[055] Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID Nº: 25);

[056] Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID Nº: 26);

[057] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (SEQ ID Nº: 27);

[058] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (SEQ ID Nº: 28);

[059] Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (SEQ ID Nº: 29);

[060] Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (SEQ ID Nº: 30);

[061] Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (SEQ ID Nº: 31); e

[062] Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (SEQ ID Nº: 32).

[063] Em uma modalidade, o terminal N e/ou terminal C de CNP22 ou uma variante do mesmo podem ser conjugados a uma extensão de aminoácido contendo 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 ou 40 aminoácidos. Em uma modalidade, a extensão de aminoácido é derivada de NPPC, CNP53, ANP ou BNP. Em uma modalidade específica, a extensão do aminoácido é Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID Nº: 33). Em uma modalidade relacionada, esta extensão de 15 aminoácidos é adicionada ao terminal N para prover uma variante de CNP da fórmula Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$(b)_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$(h)_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 34).

[064] Em uma modalidade, as variantes de CNP compreendem wtCNP22 ou uma variante do mesmo (por exemplo, uma tendo adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) tal como, por exemplo,

substituição de K4R) (SEQ ID Nº:35) conjugado ao terminal N e/ou terminal C para um polímero hidrofílico (por exemplo, PEG) para aumentar seu tamanho molecular geral para uma faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 4, 5, 6 ou 7 kDa. Tais variantes de CNP são opcionalmente conjugadas mais no terminal N e/ou terminal C a um grupo polimérico compreendendo, por exemplo, aminoácidos, carboidratos, ácidos hidrofóbicos e/ou fosfolipídeos, um exemplo não limitante do mesmo é uma extensão de aminoácido N-terminal contendo 1 a 35, ou 5 a 31, aminoácidos. Em uma modalidade, uma porção de polímero hidrofílico (por exemplo, PEG) de pelo menos cerca de 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6 ou 1,8 kDa ou até cerca de 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 ou 5 kDa é adicionada ao terminal N e/ou terminal C de wCNP22 ou uma variante do mesmo.

[065] Conforme mostrado aqui, conjugação de um polímero de PEG hidrofílico ou solúvel em água (ou PEO) de cerca de 0,6 kDa ou mais a CNP22 ou variantes do mesmo geralmente aumenta a resistência à clivagem por NEP notadamente. No entanto, adição de PEG, mesmo tão pequeno quanto 0,6 kDa, a wtCNP22 pode reduzir a funcionalidade de CNP (por exemplo, estimativa de sinalização de cGMP), e adição de mais do que cerca de 2 ou 3 kDa de PEG a CNP22 ou sus variantes pode reduzir a atividade funcional de CNP de uma maneira dependente do tamanho. Mas a funcionalidade de CNP (pelo menos comparável com aquela de wtCNP22) é retida quando um polímero de PEG (ou PEO) de cerca de 0,6 kDa a cerca de 1,2 kDa, ou potencialmente para cerca de 2 kDa, é conjugado a uma variante de CNP tendo uma extensão de aminoácido N-terminal onde pelo menos um aminoácido relativamente grande que pode ser potencialmente positivamente carregado sob condições fisiológicas (por exemplo, arginina) imediatamente precede a posição correspondendo a Gly1 de CNP22, tal co-

mo, por exemplo, 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) e R-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 41).

[066] Desta maneira, em uma modalidade, variantes de CNP PEGuiladas compreendem no terminal N de CNP22 ou uma variante do mesmo (por exemplo, uma tendo uma substituição K4R) uma extensão de aminoácido contendo pelo menos 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos, onde o polímero de PEG é conjugado ao terminal N da variante de CNP estendida em aminoácido para resultar em uma massa total caracterizada pela faixa descrita em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa para resistência aumentada à clivagem por NEP. Em uma modalidade, para funcionalidade de CNP aumentada, tais variantes de CNP estendidas em aminoácido, peguiladas, contêm pelo menos um aminoácido natural ou não natural relativamente grande que pode ser potencialmente positivamente carregado sob condições fisiológicas, imediatamente precedendo a posição correspondendo a Gly1 de CNP22. Em uma modalidade específica, as variantes de CNP estendidas com aminoácido, peguiladas, contêm pelo menos um resíduo arginina imediatamente precedendo a posição correspondendo a Gly1 de CNP22.

[067] Em adição a variantes de CNP conjugadas no terminal N e/ou terminal C a um polímero hidrofílico ou solúvel em água tal como, por exemplo, PEG (ou PEO), a invenção compreende variantes de CNP conjugadas a tal polímero em um sítio interno. Para propósitos de brevidade aqui, PEG (ou PEO) será usado como um exemplo representativo de um polímero hidrofílico ou solúvel em água. Vários sítios de PEGuilação de uma variante de CNP são possíveis, incluindo, mas não limitado a: (1) PEGuilação apenas no terminal N; (2) PEGuilação apenas no terminal C; (3) PEGuilação apenas no sítio interno (por

exemplo, Lys4); (4) PEGuilação em ambos o terminal N e o terminal C; (5) PEGuilação no terminal N e um sítio interno; e (6) PEGuilação no terminal C e um sítio interno. Para resistência aumentada à degradação por NEP e retenção de funcionalidade de CNP, em certas modalidades a massa total de variantes de CNP PEGuiladas é caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, na faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 4, 5, 6 ou 7 kDa. Em uma modalidade particular, CNP17, CNP22, CNP37 (definido abaixo) ou suas variantes (incluindo aquelas tendo adições, substituições e/ou deleções de aminoácido) são PEGuiladas apenas no terminal N. Em outra modalidade, as variantes de CNP são PEGuildas apenas em um sítio interno (por exemplo, Lys4). Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP são PEGuiladas no terminal N e um sítio interno (por exemplo, Lys4). Em ainda outra modalidade, para melhor funcionalidade as variantes de CNP não são PEGuiladas em um sítio (por exemplo, Lys10) dentro do domínio cíclico (correspondendo a Cys6 a Cys22 de CNP22). Para prevenir PEGuilação em um sítio interno, Lys4 e/ou Lys10 podem ser substituídos com um aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não contém um grupo amino primário reativo em uma cadeia lateral, tal como, por exemplo, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu ou citrulina (Cit). Em uma modalidade particular, Lys4 e/ou Lys10 são substituídos com Arg. Em outra modalidade, Lys10 não é substituído com Arg.

[068] A invenção compreende uso de polímeros hidrofílicos ou solúveis em água (por exemplo, moléculas de PEG) que podem variar em tipo (por exemplo, homopolímero ou copolímero; copolímero aleatório, alternado ou em bloco; linear ou ramificado; monodisperso ou polidisperso), ligação (por exemplo, ligação hidrolisável ou estável tal como, por exemplo, ligação amida, imina, amina, alquileno ou éster), sítio de conjugação (por exemplo, no terminal N e/ou terminal C, prefe-

rivelmente não em nenhum dos resíduos na região ciclizada de CNP (correspondendo ao resíduos 6-22 de CNP22)), e comprimento (por exemplo, de a partir de cerca de 0,2, 0,4 ou 0,6 kDa a cerca de 2, 3, 4 ou 5 kDa). O polímero hidrofílico ou solúvel em água pode ser conjugado ao peptídeo de CNP por meio de química baseada em N-hidroxi succinimida (NHS) ou aldeído ou outra química, como é conhecido na técnica. Tais variantes de CNP podem ser geradas usando, por exemplo, wtCNP-22 (2,2kDa), CNP-17 retendo apenas a região ciclizada (resíduos 6-22) de wtCNP22, variantes de CNP tendo uma extensão de aminoácido no terminal N e/ou terminal C de CNP22 ou variantes com substituições, adições e/ou deleções de aminoácido, por exemplo, 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) e ER-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 39). Em uma modalidade, as variantes de PEG-CNP tendo uma massa total caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, contêm um grupo PEG (ou PEO) linear, monodisperso, conjugado no terminal N e/ou terminal C através de química baseada em NHS ou aldeído, ou um grupo PEG ramificado de dois braços ou três braços conjugado no terminal N e/ou terminal C através de química baseada em NHS. A invenção compreende ainda variantes de PEG-CNP negativamente carregadas projetadas para excreção renal reduzida, incluindo, mas não limitado a, compostos carboxilados, sulfatados e fosforilados.

[069] Em uma modalidade relacionada, a invenção compreende conjugados de PEG-CNP compreendendo PEG baseado em NHS ou aldeído da fórmula $(CH_2CH_2O)_n$, onde n é um inteiro de a partir de 12 a 50, e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 2,5 kDa de peso molecular. Em uma modalidade específica, n é 12 ou 24. Em uma modalidade, o grupo hidroxila terminal do polímero de PEG é capeado

com um grupo não reativo. Em uma modalidade particular, o grupo de capeamento é um grupo alquila, por exemplo, um grupo alquila tal como metila.

[070] Em uma modalidade adicional, os polímeros de PEG ou seus derivados têm um peso molecular médio numérico de polímero na faixa de a partir de cerca de 0,4 kDa a cerca de 2,5 kDa ou de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 1,5 kDa.

[071] Em uma modalidade adicional, o peptídeo wtCNP ou variante de CNP é conjugado a uma porção incluindo, por exemplo, bisfosfonatos, carboidratos, ácidos hidrofóbicos (incluindo ácidos graxos) ou sequências de aminoácido. Tais sequências de aminoácido incluem, por exemplo, polyAsp ou polyGlu úteis em direcionamento a osso/cartilagem, ou podem ser derivados de proteínas osseas com domínios direcionados a osso elucidados ou seus derivados, tais como, por exemplo, proteínas de fusão ou sequências de peptídeo de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc. Em modalidades descritas aqui onde CNP22 ou uma variante do mesmo é ligado a uma porção de direcionamento a osso ou cartilagem, tal porção é projetada para promover obtenção do peptídeo CNP modificado para condrócitos de placas de crescimento ósseo, onde o peptídeo pode se ligar e ativar NPR-B nos condrócitos.

[072] Em outra modalidade, a invenção provê variantes de CNP com uma ligação de peptídeo que é menos suscetível à clivagem por peptidases incluindo NEP. A invenção compreende uma variante de CNP compreendendo pelo menos um resíduo modificado no sitio de clivagem de endopeptidase. Em uma modalidade, a ligação do peptídeo Cys6-Phe7 (-C(=O)-NH-) em um sítio de clivagem por NEP em NCP pode ser substituída com qualquer um dos isósteres ligados a peptídeo que seguem:

[073] $-CH_2-NH-$,

[074] -C(=O)-N(R)-, onde o grupo amida é alquilado com qualquer um dos grupos R que seguem: metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila,

[075] -C(=O)-NH-$CH_2$-,

[076] -CH2-S-,

[077] -CH2-S(O)n-, onde n é 1 ou 2,

[078] -CH2-CH2-,

[079] -CH=CH-,

[080] -C(=O)-CH2-,

[081] -CH(CN)-NH-,

[082] -CH(OH)-CH2-,

[083] -O-C(=O)-NH-, e

[084] -NHC(=O)NH-.

[085] Em outra modalidade, Phe7 é substituido com seu enantiômero D-Phe. Em ainda outra modalidade, enantiômeros D são introduzidos em uma ou mais, até todas as 22, posições dentro de wtCNP2. Em uma modalidade adicional, um beta aminoácido tal como ácido 3-amino-2-fenilpropiônico substitui Phe7, que aumenta o comprimento da estrutura principal enquanto reduzindo o comprimento da cadeia lateral. Em ainda outra modalidade, a invenção compreende análogos de Cys na posicao Cys6 incluindo, mas não limitado a, homocisteína, penicilamina, ácido 2-mercaptopropiônico e ácido 3-mercaptopropiônico.

[086] Mesmo na presenca de uma ligação resistente à NEP entre Cys6 e Phe7, outras ligações de peptídeo podem ser hidrolisadas por NEP, incluindo Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17 e Gly19-Leu20. Desta maneira, a invenção compreende análogos de CNP contendo isósteres de ligação de peptídeo em locais múltiplos na estrutura principal dos análogos de CNP. Em uma modalidade, análogos ou variantes de CNP compreendem modificações em mais de um

sítio de clivagem de peptidase. Em uma modalidade adicional, tal variante compreende um CNP com substituições em resíduos de aminoácido importantes em ligação ao sítio ativo de NEP, desta maneira aumentando a resistência à degradação por NEP. Um ou mais resíduos de ligação à NEP, incluindo, mas não limitado a, Gly8, Gly15, Ser18, Gly19 e/ou Gly21, são substituídos com resíduos de aminoácido naturais ou não naturais de tamanho maior para reduzir afinidade ao sítio ativo de NEP. Em ainda outra modalidade, um ou mais resíduos hidrofílicos essenciais em reconhecimento de NEP, incluindo, mas não limitado a, Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 e Leu20, são substituídos com aminoácidos naturais ou não naturais e/ou peptidomiméticos que diminuem a ligação à NEP. Em ainda outra modalidade, um a cinco dos primeiros cinco aminoácidos de CNP podem ser deletados ou substituídos com quaisquer aminoácidos naturais ou aminoácidos não naturais ou peptidomiméticos, ou um ou mais aminoácidos naturais ou não naturais ou peptidomiméticos podem ser adicionados a qualquer uma ou todas das cinco primeira posições de CNP.

[087] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, para resistência aumentada à NEP, e são representadas pela fórmula:

[088] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-(a)$_4$-$Gly_5$-(b)$_6$-(c)$_7$-(d)$_8$-(e)$_9$-(f)$_{10}$-(g)$_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-(h)$_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-(i)$_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-(j)$_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 46), onde:

[089] (x) pode estar ausente ou pode ser selecionado do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tais como, por exemplo, bifosfonatos; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso ou cartilagem tal como, por exemplo, poliAsp ou poliGlu; sequências de aminoácido derivadas de proteínas ósseas

com domínios de direcionamento a osso elucidados, tais como, por exemplo, proteínas de fusão ou sequências de peptídeo de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc; moléculas poliméricas ou não poliméricas que reduzem a excreção renal tais como, por exemplo, moléculas de PEG carregadas; e extensões compreendendo, por exemplo, polímeros (por exemplo, PEGs), carboidratos, ácido hidrofóbicos (incluindo ácidos graxos) e/ou aminoácidos, e onde tais extensões de aminoácido podem conter, por exemplo, de a partir de 1 a 31, ou 1 a 35, ou 5 a 35, ou 10 a 35, ou 15 a 35 resíduos de aminoácido e podem ser derivadas de NPPC, ANP, BNP, outros (poli)peptídeos não CNP tais como, por exemplo, albumina do soro ou IgG, ou variantes dos polipeptídeos mencionados acima tendo substituições, adições e/ou deleções, ou suas combinações;

[090] (z) pode estar ausente ou pode ser selecionado do grupo consistindo em sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso ou cartilagem tais como, por exemplo, polyAsp e polyGlu, sequências de aminoácido de domínios de direção a osso de proteínas do osso tais como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína, e sequências de amino ácido derivadas de (poli)peptídeos não CNP tal como, por exemplo, ANP ou BNP;

[091] (a) pode ser o Lys do tipo selvagem na posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (a) é Arg;

[092] (b) é selecionado do grupo consistindo em Cys e isósteres ligados a peptídeo entre Cys6 e Phe7 tal como, por exemplo, Cys-$CH_2$-NH;

[093] (c) é selecionado do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe;

ácido 3-amino-2-fenilpropiônico; derivados N-alquilados de Phe, onde o grupo alquila é metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila; e análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto, meta e/ou para do anel benzeno do análogo de Phe são substituídas com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi de cadeia reta ou ramificada, halo $C_{1-6}$ alquila reta ou ramificada, $C_{3-10}$ cicloalquila, heterociclila, $C_{6-14}$ arila e heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalanina, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalanina) ou onde o anel benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e 2-naftilalanina) ou com um grupo heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilalanina, tienilalanina e furilalanina);

[094] (d) é selecionado do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val e Asn;

[095] (e) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[096] (f) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (f) não é Arg;

[097] (g) é selecionado do grupo consistindo em Leu e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[098] (h) é selecionado do grupo consistindo em Ile, tBu-Gly e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[099] (i) é selecionado do grupo consistindo em Met, Val, Asn,

beta-Cl-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) e ácido 2-amino-isobutírico (Aib); e

[0100] (j) é selecionado do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, *terc*-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg e isósteres ligados a peptídeo tal como N-Me-Leu.

[0101] Em uma modalidade, as variantes de CNP compreendem uma modificação em uma ou mais posições 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 e/ou 20 e podem ter opcionalmente modificações em qualquer uma das outras posições reveladas aqui.

[0102] Em modalidades descritas aqui onde CNP22 ou suas variantes podem ser ligados a um ácido hidrofóbico, os peptídeos NCP podem ser ligados a um ou ácidos hidrofóbicos. Exemplos não limitantes de ácidos hidrofóbicos incluem ácidos $C_{5-12}$ carboxílicos de cadeia reta ou ramificada, saturados ou insaturados (por exemplo, ácido pentanoico, ácido heptanoico, etc) e ácidos graxos naturais. Os ácidos hidrofóbicos podem ser ligados ao terminal N, ao terminal C e/ou à cadeia lateral de um ou mais resíduos de aminoácido. Em uma modalidade, os ácidos hidrofóbicos são conjugados ao terminal N. Em uma modalidade, conjugação de CNP22 ou uma variante do mesmo a um ácido hidrofóbico é projetada, *inter alia*, para promover interação não específica entre o peptídeo de CNP modificado e albumina do soro, desta maneira aumentando o tamanho do peptídeo CNP e protegendo-o de clivagem por proteases tal como, por exemplo, NEP. A interação entre o peptídeo CNP conjugado a ácido hidrofóbico e albumina é projetada para não ser muito forte, de maneira que o peptídeo CNP modificado pode difundir através da cartilagem, chegar aos condrócitos de placas de crescimento ósseo e se ligar e ativar NPR-B.

[0103] Em uma modalidade adicional, a invenção provê variantes de CNP que *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%,

140% ou 150% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM), compreendem pelo menos um aminoácido modificado na posição $(b)_6$, $(c)_7$ e/ou $(d)_8$, e são representados pela fórmula:

[0104] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$(a)_4$-$Gly_5$-$(b)_6$-$(c)_7$-$(d)_8$-$(e)_9$-$(f)_{10}$-$(g)_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$(h)_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$(i)_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$(j)_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 47), onde:

[0105] (x) pode estar ausente ou pode ser uma sequência de peptídeo contendo um a cinco aminoácidos que é derivada de um polipeptídeo natriurético (por exemplo, NPPC, CNP, ANP ou BNP) ou um polipeptídeo não natriurético conforme aqui descrito (por exemplo, HSA, IgG, uma proteína de direcionamento a osso, etc);

[0106] (z) pode estar ausente ou pode ser selecionado do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tal como, por exemplo, bifosfonato; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso/cartilagem tais como, por exemplo, poliAsp e poliGly; proteínas do osso com domínios de direcionamento a osso e seus derivados, tais como proteínas de fusão ou sequências de peptídeo de osteopontina, osteocalcina e sialoproteína; moléculas que reduzem a excreção rena tais como, por exemplo, PEGs carregadas; e moléculas que aumentam a resistência de CNP à degradação mediada por NEP, conforme aqui descrito;

[0107] (a) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (a) é Arg;

[0108] (b) pode ser Cys ou descarboxi cisteína ou a ligação de peptídeo $(b)_6$-$(c)_7$ (-C(=O)-NH-) pode ser substituída com qualquer um

dos isósteres de ligação de peptídeo que seguem:

[0109] $-CH_2-NH-$,

[0110] -C(=O)-N(R)-, onde o grupo amida é alquilado com qualquer um dos grupos R que seguem: metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila,

[0111] $-C(=O)-NH-CH_2-$,

[0112] $-CH_2-S-$,

[0113] -CH2-S(O)n-, onde n é 1 ou 2,

[0114] -CH2-CH2-,

[0115] -CH=CH-,

[0116] -C(=O)-CH2-,

[0117] -CH(CN)-NH-,

[0118] -CH(OH)-CH2-,

[0119] -O-C(=O)-NH-, ou

[0120] -NHC(=O)NH-;

[0121] (c) é selecionado do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiônico; isósteres de ligação a peptídeo de Phe tais como derivados N-alquilados de Phe onde o grupo N-alquila é selecionado do grupo consistindo em metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila e *terc*-butila; e análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto-, meta- e para- do anel benzeno do análogo de Phe são substituídas com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi de cadeia reta ou ramificada, halo-$C_{1-6}$-alquila reta ou ramificada, $C_{3-10}$ cicloalquila, $C_{6-14}$ arila, heterociclila e heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalanina, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalanina0 ou onde o anel benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e 2-naftilalanina) ou com um gru-

po heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilalanina, tienilalanina e furilalanina);

[0122] (d) é selecionado do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr e Asn;

[0123] (e) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isósteres ligado a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0124] (f) é qualquer aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem um grupo amino primário reativo em uma cadeia lateral incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (f) não é Arg;

[0125] (g) é selecionado do grupo consistindo em Leu e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0126] (h) é selecionado do grupo consistindo em Ile, tBU-Gly e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[0127] (i) é selecionado do grupo consistindo em Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminoisobutírico (Abu) e ácido 2-amino-isobutírico (Aib); e

[0128] (j) é selecionado do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, terc-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu.

[0129] Em uma modalidade adicional, a invenção compreende variantes de CNP que in vitro ou in vivo estimulam a produção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% ou 150% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM), têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa para resistência aumentada à degradação por NEP, e são representadas pela fórmula geral:

[0130] (x)-(y)-Cys6-Phe7-Gly8-Leu9-(h)10-Leu11-Asp12-Arg13-Ile14-Gly15-Ser16-Met17-Ser18-Gly19-Leu20-Gly21-Cys22-(z) (SEQ ID Nº: 48), onde:

[0131] (x) é um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é polietileno glicol (PEG), e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido contendo de a partir de 1 a 35 aminoácidos e derivada de NPPC ou variantes da mesma com substituições e/ou deleções, ANP, BNP ou outros (poli)peptídeos não CNP tais como, por exemplo, albumina do soro, IgG, glicoproteínas ricas em histicina, fibronectina, fibrinogênio, polipeptídeos contendo dedo de zinco, osteocrina ou FGF2;

[0132] (y) pode estar ausente ou pode ser um ou mais aminoácidos de $Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$Lys_4$-$Gly_5$ (correspondendo às posições 1 a 5 de CNP22) (SEQ ID Nº:1) e/ou substituições em uma ou mais dessas posições usando aminoácidos naturais ou não naturais (por exemplo, substituição de K4R);

[0133] (h) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (h) não é Arg; e

[0134] (z) pode estar ausente ou pode ser um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é PEG, e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido derivada de um polipeptídeo natriurético (por exemplo, NPPC, CNP, ANP ou BNP) ou um polipeptídeo não natriurético (por exemplo, albumina do soro ou IgG).

[0135] Em uma modalidade, (x), (y) e (z) juntos contêm de a partir de cerca de 10 a cerca de 40 ou de a partir de cerca de 15 a cerca de 35 aminoácidos. Em outra modalidade, (x) é uma sequência de aminoácido compreendendo de a partir de 1 a 40 aminoácidos ou de a partir de 1 a 20 aminoácidos.

[0136] São ainda compreendidas variantes de CNP que *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% ou 150% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM) e compreendem a sequência:

[0137] (y)-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$Lys_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$ (SEQ ID Nº: 138), onde:

[0138] (y) compreende um ou mais aminoácidos selecionados de $Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$Lys_4$-$Gly_5$ (SEQ ID Nº: 1) e/ou substituições em uma ou mais dessas posições usando aminoácidos naturais ou não naturais (por exemplo, substituição com K4R) e compreende ainda um polímero hidrofílico ou solúvel em água de peso molecular de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 5 kDa. Em uma modalidade, o polímero hidrofílico ou solúvel em água é conjugado ao terminal N de tal variante de CNP estendida em aminoácido. Em uma modalidade particular, o polímero hidrofílico ou solúvel em água é PEG (PEO).

[0139] Em ainda outra modalidade, a invenção provê variantes de CNP que *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% ou 150% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM), onde as variantes de CNP compreendem uma extensão de peptídeo N-terminal e/ou C-terminal contendo de a partir de 1 a 15 aminoácidos, e são conjugadas a um polímero hidrofílico ou solúvel em água. Em uma modalidade, a extensão do peptídeo contém de a partir de cerca de 5 a 10 aminoácidos. Em uma

modalidade específica, a extensão de peptídeo contém 5 aminoácidos. Em outra modalidade específica, o polímero hidrofílico ou solúvel em água é PEG (ou PEO).

[0140] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP da invenção *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% ou 150% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM) e compreendem pelo menos um fragmento de 15 aminoácidos derivado de precursor de peptídeo natriurético C (NPPC), onde o fragmento é pelo menos 70% homólogo a uma sequência de NPPC do tipo selvagem contendo o mesmo número de resíduos de aminoácido.

[0141] Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa para aumento da resistência à NEP e são representadas pela fórmula:

[0142] $(x)\text{-}(b)_6\text{-}(c)_7\text{-}(d)_8\text{-}(e)_9\text{-}(f)_{10}\text{-}(g)_{11}\text{-}Asp_{12}\text{-}Arg_{13}\text{-}(h)_{14}\text{-}Gly_{15}\text{-}Ser_{16}\text{-}(i)_{17}\text{-}Ser_{18}\text{-}Gly_{19}\text{-}(j)_{20}\text{-}Gly_{21}\text{-}Cys_{22}\text{-}(z)$ (SEQ ID Nº: 49), onde:

[0143] (x) pode estar ausente (isto é, as extremidades do terminal N com um grupo $–NH_2$) ou pode ser selecionado do grupo consistindo em uma sequência de 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos do peptídeo $Gly_1\text{-}Leu_2\text{-}Ser_3\text{-}Lys_4\text{-}Gly_5$ (SEQ ID Nº: 1); sequências de aminoácido úteis tal como, por exemplo, polyAsp ou polyGlu; domínios de direcionamento a osso de proteínas do osso tal como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina ou sialoproteína; moléculas que reduzem a excreção renal tais como polímeros hidrofílicos ou solúveis em água, incluindo, mas não limitado a, moléculas de PEG carregadas; e porções compreendendo PEG, carboidratos, ácidos hidrofóbicos, aminoácidos, ou combinações dos mesmos, onde tais porções podem ser extensões de

aminoácido incluindo, mas não limitado a, sequências de aminoácido derivadas de (poli)peptídeos NPPC ou não NPPC tais como, por exemplo, BNP, ANP, albumina do soro ou IgG;

[0144] (z) pode estar ausente ou pode ser selecionado do grupo consistindo em sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso/cartilagem tal como, por exemplo, polyAsp ou polyGlu; sequências de aminoácido derivadas de proteínas de direcionamento a osso, tal como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina ou sialoproteína; e sequências de aminoácido derivadas de (poli)peptídeos NPPC ou não CNP, conforme descrito aqui:

[0145] (b) é selecionado do grupo consistindo em Cys e isósteres ligados a peptídeo entre Cys e Phe7 tal como, por exemplo, Cys-$CH_2$-NH;

[0146] (c) é selecionado do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiônico; derivados N-alquilados de Phe, onde o grupo N-alquila é metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila; e análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto-, meta- e/ou para- do anel benzeno do análogo de Phe são substituídas com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi reto ou ramificado, halo-$C_{1-6}$-alquila reta ou ramificado, $C_{3-10}$ cicloalquila, $C_{6-14}$ arila, heterociclila e heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalania, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalania, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalaina), ou onde o anel benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e -2-naftilalanina) ou com um grupo heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilalanina, tienilalanina e furilalanina);

[0147] (d) é selecionado do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr e Asn;

[0148] (e) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0149] (f) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (f) não é Arg;

[0150] (g) é selecionado do grupo consistindo em Leu e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0151] (h) é selecionado do grupo consistindo em Ile, tBu-Gly e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[0152] (i) é selecionado do grupo consistindo em Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) e ácido 2-amino-isobutírico (Aib); e

[0153] (j) é selecionado do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, *terc*-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu.

[0154] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa para aumento de resistência à NEP e são representados pela fórmula:

[0155] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-(a)$_4$-$Gly_5$-(b)$_6$-(c)$_7$-(d)$_8$-(e)$_9$-(f)$_{10}$-(g)$_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-(h)$_{14}$-(i)$_{15}$-$Ser_{16}$-(j)$_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-(k)$_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 50), onde:

[0156] (x) e (z) podem estar independentemente ausentes ou podem ser selecionados do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tais como, por exemplo, bifosfonatos; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso/cartilagem tal

como, por exemplo, polyAsp ou polyGlu; sequências de aminoácido derivadas de domínios de direção a osso de proteínas do osso e seus derivados, tais como, por exemplo, proteínas de fusão ou sequências de peptídeo de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc; porções que reduzem a excreção renal, incluindo, mas não limitado a, polímeros hidrofílicos ou solúveis em água tais como, por exemplo, moléculas de PEG carregadas; e porções compreendendo, por exemplo, polímeros hidrofílicos (por exemplo, PEG), carboidratos, ácidos hidrofóbicos e/ou aminoácidos;

[0157] (a) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (a) é Arg:

[0158] (b) é selecionado do grupo consistindo em Cys e isósteres ligados a peptídeo entre Cys6 e Phe7 tal como, por exemplo, Cys-$CH_2$-NH;

[0159] (c) é selecionado do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe; ácido 3-amino-2-fenilpropiônico, derivados N-alquilados de Phe, onde o grupo N-alquila é metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila; e análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto-, meta- e/ou para- do anel benzeo do análogo de Phe são substituídos com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi de cadeia reta ou ramificada, halo-$_{C1-6}$-alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{3-10}$ cicloalquila, $C_{6-14}$ arila, heterociclila ou heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalanina, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalanina) ou onde o anel

benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e 2-naftilalanina) ou com um grupo heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilalanina, tienilalanina ou furilalanina);

[0160] (d) é selecionado do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly, Thr, Ser, Val e Asn;

[0161] (e) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0162] (f) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (f) não é Arg;

[0163] (g) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Asn e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0164] (h) é selecionado do grupo consistindo em Ile, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Asn e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[0165] (i) é selecionado do grupo consistindo em Gly, Arg, Ser e Asn;

[0166] (j) é selecionado do grupo consistindo em Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) e ácido 2-amino-isobutírico (Aib); e

[0167] (k) é selecionado do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, *terc*-butil-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser e isósteres ligados a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu.

[0168] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP podem ter substituição(ões) de aminoácido em uma ou mais de qualquer uma das posições 1 a 22 de CNP22. Em uma modalidade, Gly1 é substituí-

do com Arg ou Glu. Em outra modalidade, Lys4 é substituído com Arg. Em ainda outra modalidade, Gly5 é substituído com Arg, Gln ou Ser. Em ainda outra modalidade, Gly15 é substituído com Ser, Asn, Arg ou Cit. Em uma modalidade adicional, Gly19 é substituído com Ser, Arg ou Asn. Em ainda outra modalidade, Gly 21 é substituído com Ser, Thr ou Arg.

[0169] Em ainda outra modalidade, a variante de CNP é selecionada do grupo consistindo em GLSKGC($CH_2NH$)FGLKLDRIGSMSGLGC (formado usando descarbóxi-Cys) (SEQ ID Nº: 56), GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 57), GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC(SEQ ID Nº:136), GLSKGCF-(tBuG)-LKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 58), GLSKGC-(3-Cl-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº:137) e GLSKGC-[$NHCH_2CH(Ph)CO$]-GLKLDRIGSMSGLGC (formado usando ácido 3-amino-2-fenilpropiônico) (SEQ ID Nº:59). Em uma modalidade adicional, uma ligação dissulfeto existe entre Cys6, descarbóxi-Cys ou outro análogo de cisteína contendo sulfidrila na posição Cys6, e Cys22 de qualquer variante de CNT descrita aqui.

[0170] Em outra modalidade, as variantes de CNP contêm uma extensão de aminoácido no terminal N e/ou terminal C de CNP22 ou CNP17, incluindo, mas não limitado a:

[0171] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKG-CFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-53**) (SEQ ID Nº: 4);

[0172] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-37**, **Análogo BL**) (SEQ ID Nº: 60);

[0173] AAWARLLQEHPNAGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CA**) (SEQ ID Nº: 61);

[0174] AAWARLLQEHPNARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CB**) (SEQ ID Nº: 62);

[0175] DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(**Análogo CC**) (SEQ ID Nº: 63);

[0176] RGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 40);

[0177] ERGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 38);

[0178] GANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 64);

[0179] GANRRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 65);

[0180] GANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 66);

[0181] GANSSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 67);

[0182] GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 144) (algumas vezes chamado "CNP27-HSA" ou "HSA-CNP27" nos Exemplos e figuras);

[0183] SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (**Análogo CD**) (SEQ ID Nº: 68) (CNP17 tendo caudas N-terminais e C-terminais derivadas de BNP).

[0184] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP têm uma substituição de K4R na posição 4 de CNP22. Exemplos não limitantes de variantes de NCP(K4R) incluem:

[0185] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo AY**) ((SEQ ID Nº: 36);

[0186] GANPRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CI**) (SEQ ID Nº: 37);

[0187] RGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo AZ**) (SEQ ID Nº: 41);

[0188] ERGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo BA**) (SEQ ID Nº: 39);

[0189] GANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CH**) (SEQ ID Nº: 69); e

[0190] GANSSGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CG**) (SEQ ID Nº: 70).

[0191] Em uma modalidade, variantes de CNP tendo uma porção de PEG (ou PEO) e uma extensão de aminoácido no terminal N con-

têm arginina na posição imediatamente precedente a posição correspondendo a Gly1 de CNP22. Tais variantes de CNP PEGuiladas são projetadas para resistência aumentada à degradação por NET, ligação reduzida à albumina do soro e atividade funcional de CNP aumentada (por exemplo, ativação de sinalização de cGMP). Exemplos não limitantes de variantes de CNP PEGuiladas incluem 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) e PEO12-R-CNP22(SEQ ID Nº: 40), onde PEO24 é um polímero de PEG de 1,2 kDa monodisperso e PEO12 é um polímero de PEG de 0,6 kDa monodisperso. Em uma modalidade, o polímero de PEG é ligado ao terminal N das variantes de CNP.

[0192] Variantes de CNP adicionais incluem, mas não estão limitadas a, derivados de CNP37 tendo mutação(ões) no sítio de clivagem furina (sublinhado), projetadas para aperfeiçoar a resistência *in vivo* à proteína furina e/ou tendo glicina (sublinhada) precedendo glutamina, projetado para prevenir formação de piroglutamina, incluindo, mas não limitado a:

[0193] GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CS**) (SEQ ID Nº: 71); GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CT**) (SEQ ID Nº: 72); GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CU**) (SEQ ID Nº: 73);

GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CW**) (SEQ ID Nº: 74);

[0194] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37, **An. DB**) (SEQ ID Nº: 75);

[0195] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID Nº: 145).

[0196] Em outra modalidade, as variantes de CNP são quimeras compreendendo CNP22 e um fragmento de peptídeo N-terminal incluindo, mas não limitado a:

[0197] GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CQ**) (quimera de fragmento de glicoproteína rica em histidina (HRGP) -CNP22) (SEQ ID Nº: 76);

[0198] GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CR**) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID Nº: 77);

[0199] GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CX**) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID Nº: 78);

[0200] GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CF**) (quimera de fragmento de $IgG_1(F_c)$-CNP22) (SEQ ID Nº: 79);

[0201] GQHKDDNPNLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (**Análogo CY**) (quimera de fragmento de albumina de soro humano (HSA)-CNP22 (SEQ ID Nº: 80);

[0202] GERAFKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CE**) (quimera de fragmento de HSA-CNP22) (SEQ ID Nº: 81);

[0203] FGIPMDRIGRNPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CZ**) (quimera de fragmento "de inibidor de CPR C" osteocrina-CNP22) (SEQ ID Nº: 82); e

[0204] GKRTGQYKLGSKTGPGPKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (**Análogo DA**) (quimera de fragmento "de domínio e ligação à heparina" FGF2) (SEQ ID Nº: 83).

[0205] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP são quimeras compreendendo um fragmento de peptídeo N-terminal e CNP22 onde arginina substitui Lys4 de CNP22 ("CNP22(K4R)"), incluindo, mas não limitado a:

[0206] GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CK**) (quimera de fragmento de $IgG_1(F_c)$-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 84);

[0207] GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CL**) (quimera de fragmento de HSA-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 85

[0208] GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CM**) (quimera de fragmento de fibronectina-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 86);

[0209] GQTHSSGTQSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CN**) (quimera de fragmento de fibrinogênio-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 87);

[0210] GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CO**) (quimera de fragmento de fibrinogênio-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 88); e

[0211] GSSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CP**) (quimera de fragmento de dedo de zinco-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 89).

[0212] Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP são quimeras, ou proteínas de fusão, compreendendo um peptídeo ou variante de CNP, e um peptídeo ou proteína clivável, ou marcador de peptídeo. Proteínas ou peptídeos cliváveis exemplares incluem, mas não estão limitados a, marcadores de histidina (por exemplo, hexa-His);

TAF12: fator de transcrição humano TAF12; KSI: cetoesteroide isomerase; MBP: proteína de ligação à maltose; β-Gal; β-galactosidase; GST: glutationa-S-transferase; Trx: tiorredoxina; CBD: domínio de ligação à quitina; BMPM: mutação de BMP-2, SUMO, CAT, TrpE, proteína *staphylococcal* A, proteínas *streptococcais*, proteína de ligação a antígeno, domínio de ligação à celulose de endoglucanase A, domínio de ligação à celulose de exoglucanase Cex, domínio de ligação à biotina, recA, Flag, c-Myc, poly(His), poly(Arg), poly(Asp), poly(Gln), poly(Phe), poly(Cys), proteína verde fluorescente, proteína vermelho fluorescente, proteína amarelo fluorescente, proteína ciano fluorescente, biotina, avidina, estreptavidina, epítopos de anticorpo e fragmentos dos mesmos.

[0213] Em ainda outra modalidade, a variante de CNP pode ser um monômero ou um dímero. Em uma modalidade relacionada os monômeros de variantes de CNP diméricas podem ser ligados N-terminal para terminal N através de um ligante ou nenhum ligante, N-terminal para C-terminal através de um ligante ou nenhum ligante ou C-terminal para C-terminal através de um ligante ou nenhum ligante.

[0214] Quimeras compreendendo um fragmento de IgG e CNP22 ou variante do mesmo são projetadas para, *inter alia*, resistência aumentada à degradação por NEP e ligação reduzida à albumina do soro. Quimeras de CNP compreendendo um fragmento de HSA na superfície são projetadas para, *inter alia*, imunogenicidade reduzida e ligação reduzida à albumina do soro. Quimeras de HGRP-CNP22 e HGRPNCP22(K4R) contendo uma sequência catiônica, rica em histidina, não lisina, não arginina, no terminal N são projetadas para, *inter alia*, estabilidade aumentada a proteases. Quimeras contendo um fragmento de osteocrina são projetadas para liberar, quando da clivagem de protease (por exemplo, furina), o fragmento de osteocrina em placas de crescimento ósseo, onde o fragmento inibiria a liberação do re-

ceptor NPR-C. Com relação à quimera compreendendo um fragmento de ligação à heparina FGF2, ligação de heparina ao fragmento é projetada para proteger a quimera de degradação, desta maneira provendo uma meia-vida no soro mais longa. Quimeras contendo um fragmento de fibronectina, fibrinogênio ou dedo de zinco são projetadas para ligação reduzida à albumina do soro, dentre outras características vantajosas.

[0215] Sem pretender ser limitado pela teoria, uma variante de CNP de peso molecular de a partir de cerca de 2,6 kDa a 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa que tem resistência aumentada à degradação por NEP e tem funcionalidade similar ou aperfeiçoada (por exemplo, ligação a NPR-B e estimulação de sinalização de cGMP) comparado com wtCNP22, pode ser mais eficaz se ela não se ligar firmemente a proteínas do plasma tal como albumina do soro. Uma variante de CNP que não se liga firmemente a proteínas do plasma (por exemplo, albumina do soro) pode ser mais eficaz em difusão através da cartilagem, atingindo condrócitos de placas de crescimento ósseo, e ligação a e ativação de NPR-B para sinalização de cGMP. Em uma modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma (por exemplo, albumina do soro) são quimeras compreendendo CNP22 ou uma variante do mesmo e um fragmento de peptídeo de IgG. Em outra modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma são quimeras compreendendo CNP22 ou NCP22(K4R) e um fragmento de um polipeptídeo (por exemplo, IgG, HSA, fibronectina, fibrinogênio, um polipeptídeo contendo dedo de zinco, etc). Em ainda outra modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma compreendem NCP22 ou uma variante do mesmo conjugado a um polímero hidrofílico ou solúvel em água. Em uma modalidade, o polímero hidrofílico ou solúvel em água é PEG (ou PEO). Em outra modalidade, o polímero

hidrofílico ou solúvel em água (por exemplo, PEG) é funcionalizado com um ou mais grupos funcionais que fornecem uma carga negativa ao polímero sob condições fisiológicas, tais como grupos carboxila, sulfato ou fosfato, ou uma combinação dos mesmos.

[0216] Em qualquer uma das modalidades reveladas aqui, as variantes de CNP podem ter substancialmente a mesma atividade biológica ou melhor do que o CNP22 do tipo selvagem. Por exemplo, as variantes de CNP podem reter pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais da atividade de CNP22 do tipo selvagem ou podem ter atividade maior do que CNP22, por exemplo, com relação à interação com NPR-B (GC-B) para estimular a geração de cGMP. Alternativamente, ou em adição, as variantes de CNP podem reter pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais da atividade de CNP22 do tipo selvagem ou podem ter atividade maior do que CNP22, com relação à regulagem de crescimento de osso endocondral e atividade de condrócito, incluindo, mas não limitado a, proliferação de condrócito, diferenciação de condrócito, inibição do curso de sinalização proteína ativada por mitógeno cinase (MAP)/MEK (Raf-1) cinase, e promoção de ossificação endocondral. Em qualquer uma das modalidades descritas aqui, as variantes de CNP podem compreender uma sequência de aminoácido que é pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais idêntica ou homóloga aos aminoácidos 6-22 ou 1-22 de CNP22 do tipo selvagem.

[0217] Em uma modalidade adicional, a invenção provê variantes de CNP22 tendo menos afinidade para o receptor de excreção de NPR-C enquanto retendo a habilidade em se ligar e ativar NPR-B. A presente invenção compreende variantes que foram, ou podem ser, geradas a partir de um modelo estrutural baseado em homologia do complexo NPR-B/CNP conforme descrito no Relatório Descritivo. Em outra modalidade, as variantes de CNP têm substituição(ões) em um

ou mais sítios Gly nas posições 1, 5, 8, 15, 19 e 21 para reduzir a flexibilidade conformacional, o que pode aumentar sua especificidade para ligação a NPR-B com relação a NPR-C. Variantes de CNP tendo afinidade potencialmente reduzida para NPR-C incluem, mas não estão limitadas a, aquelas tendo uma ou mais das substituições que seguem: 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 e G21R**.**

[0218] Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP têm uma modificação e/ou substituição em uma ou mais das posições 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 e 21 e podem opcionalmente ter modificações e/ou substituições em qualquer uma das outras posições reveladas aqui. Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP podem ter opcionalmente conjugação(ões) ou extensão(ões), por exemplo, nos terminais N- e/ou C- para facilitar direcionamento a osso/cartilagem, reduzir excreção renal e/ou aumentar a resistência à degradação por NEP. Tal conjugação(ões) ou extensão(ões) pode(m) compreender moléculas ou sequências formadas ou derivadas das mesmas, por exemplo, polyAsp, polyGlu, peptídeos de direcionamento a osso ou cartilagem, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, PEGs, carboidratos, ácido hidrofóbicos, (poli)peptídeos NPPC ou não CNP ou combinações dos mesmos.

[0219] Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP são preparadas através de métodos de síntese de peptídeo de fase sólida padrão com aminoácido(s) ou peptidomimético(s) naturais ou não naturais sendo substituído(s) e/ou adicionado(s) onde apropriado. Em outra modalidade, as variantes de CNP são produzidas através de processos de síntese recombinante, por exemplo, através de proteínas de fusão contendo um marcador ou proteína carreadora, onde uso do

marcador ou proteína carreadora facilita, por exemplo, detecção, isolamento e/ou purificação da proteína de fusão e clivagem química ou proteolítica seletiva do marcador ou proteína carreadora a partir da proteína de fusão provê a variante de CNP alvo. Em uma modalidade adicional, PEGuilação das variantes de CNP ocorre seguindo, ou parte de, síntese química ou biológica com a reação de conjugação sendo realizada através de química baseada em NHS ou aldeído ou outra química conhecida na técnica. Em outra modalidade, as variantes de CNP compreendem uma ligação dissulfeto. Em uma modalidade relacionada, a ligação dissulfeto forma um peptídeo cíclico. Em uma modalidade particular, a ligação dissulfeto é formada entre resíduos cisteína nas posições correspondendo às posições 6 e 22 de CNP22.

[0220] É ainda compreendido que as variantes de CNP podem ser conjugadas a uma porção polimérica ou não polimérica hidrofóbica, tal como, por exemplo, ácido heptanoico, ácido pentanoico ou ácidos graxos. A porção hidrofóbica pode ser conjugada à cadeia lateral de um resíduo de aminoácido incluindo, mas não limitado a, uma lisina, uma serina, uma cisteína ou uma treonina, ou pode ser ligada ao terminal N e/ou terminal C da variante de CNP.

[0221] Em uma modalidade, as variantes de CNP conforme aqui descrito têm um pI na faixa de a partir de cerca de 8 a cerca de 10,5 ou de a partir de cerca de 8,5 a cerca de 10.

[0222] Em uma modalidade adicional, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo uma variante de CNP, opcionalmente outro agente biologicamente ativo e opcionalmente um excipiente, carreador ou diluente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, as composições são composições farmacêuticas estéreis adequadas para injeção parenteral. Em algumas modalidades, as composições compreendem variante de CNP substancialmente pura, por exemplo, pelo menos cerca de 90% ou 95% pura. Em algumas

modalidades, as composições contêm menos do que cerca de 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0,5% de contaminantes, tais como outras proteínas humanas, proteínas do porco ou CNP53 ou seus fragmentos (outra que não a variante de NCP desejada). Em certas modalidades, a composição estéril é administrada a um indivíduo para tratamento ou prevenção de qualquer uma das condições ou distúrbios responsivos a CNP revelados aqui.

[0223] As variantes de CNP da invenção vantajosamente retêm atividade de CNP e exibem meia-vida no soro aumentada. Retenção da atividade de CNP pode ser mostrada, por exemplo, como retenção de efeitos biológicos *in vivo* desejados ou retenção de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou pelo menos cerca de 100% da atividade de estimulação de cGMP de CNP22, sob a mesma concentração (por exemplo, 1 uM de peptídeo de CNP ou maior do que o ED80). Em algumas modalidades, variantes de CNP exibem pelo menos um aumento de cerca de 1,5 vez, duas vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 35 vezes ou 40 vezes na meia-vida do soro comparado com CNP22.

[0224] Em uma modalidade relacionada, as variantes de CNP descritas aqui têm resistência à NEP aumentada e exibem meia-vida no soro aumentada comparado com CNP22 do tipo selvagem. Em uma modalidade, a meia-vida das variantes de CNP é aumentada em cerca de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou cerca de 100% comparado com CNP22 do tipo selvagem.

[0225] Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui aumentam a produção de cGMP *in vitro*, aumentam a produção de cGMP *in vivo*, aumentam *in vivo* o nível de um ou mais biomarcadores de biomassa associados com formação ou crescimento de cartilagem ou osso, aumentam a resistência à clivagem por NEP *in vitro*, aumen-

tam a meia-vida *in vivo* no plasma ou soro, aumentam a biodisponibilidade *in vivo* ou aumentam o comprimento de ossos particulares *in vivo*, ou realizam combinações de tais aumentos, em cerca de 1,5 vez, cerca de duas vezes, cerca de 2,5 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 3,5 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 4,5 vezes ou cerca de 5 vezes ou mais comparado com o CNP22 do tipo selvagem.

[0226] Em ainda outra modalidade, a invenção provê métodos de tratamento de condições ou distúrbios responsivos a CNP compreendendo administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante de CNP ou uma composição compreendendo a mesma a um indivíduo com necessidade. Em uma modalidade, distúrbios responsivos a CNP são distúrbios de crescimento de osso incluindo, mas não limitado a, displasias esqueléticas e más formações esqueléticas herdadas tais como distúrbios associados com mutações do receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 (FGFR-3). Em uma modalidade específica, o distúrbio associado com mutação(ões) de FGFR-3 é acondroplasia. Em outra modalidade, os distúrbios responsivos a CNP são distúrbios associados com células e tecidos do músculo liso vascular. Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP são úteis para aumento do tamanho da placa de crescimento de um osso (por exemplo, osso do membro). Em outra modalidade, as variantes de CNP são úteis para alongamento de um osso ou aumento do crescimento do osso longo. Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP são úteis para aumento da produção, proliferação e diferenciação de condrócitos de matriz.

[0227] Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são administradas em uma dose na faixa de a partir de cerca de 5 ou 10 nmol/kg a cerca de 300 nmol/kg ou de a partir de cerca de 20 nmol/kg a cerca de 200 nmol/kg. Em algumas modalidades, as variantes de CNP são administradas em uma dose de cerca de 5, 10, 15, 20,

25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ou 2000 nmol/kg ou outra dose considerada apropriada pelo médico responsável pelo tratamento. Em outras modalidades, as variantes de CNP são administradas em uma dose de cerca de 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 ou 800 ug/kg ou cerca de 1 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg ou outra dose considerada apropriada pelo médico responsável pelo tratamento. As doses de variantes de CNP descritas aqui podem ser administradas de acordo com a frequência de dosagem/frequência de administração descrita aqui, incluindo, sem limitação, diariamente, 2 ou 3 vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas, a cada 3 semanas, mensalmente, etc.

[0228] Em outra modalidade, as variantes de CNP são administradas em um tratamento único ou em doses múltiplas. As doses múltiplas podem ser administradas diariamente ou em doses múltiplas durante o curso do tratamento. Em certas modalidades, é compreendido que a variante de CNP é administrada, em uma dose única ou em doses múltiplas, diariamente, dia-sim-dia-não, a cada 3 dias, duas vezes por semana, 3 vezes por semana, semanalmente, duas vezes semanalmente, a cada 3 meses, a cada 6 semanas a cada 2 meses a cada 3 meses ou conforme considerado apropriado pelo médico responsável pelo tratamento.

[0229] Em certas modalidades, administração da variante de CNP é ajustada para permitir períodos de crescimento (por exemplo, condrogênese), seguido por um período de recuperação (por exemplo, osteogênese). Por exemplo, a variante de CNP pode ser administrada subcutaneamente, intravenosamente ou através de outro modo diariamente ou várias vezes por semana por um período de tempo, segui-

do por um período de nenhum tratamento, então o ciclo é repetido. Em algumas modalidades, o período inicial de tratamento (por exemplo, administração da variante de CNP diariamente ou múltiplas vezes por semana) é por 3 dias, uma semana, duas semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas ou 12 semanas. Em uma modalidade relacionada, o período sem nenhum tratamento dura 3 dias, uma semana, duas semanas, 3 semanas ou 4 semanas. Em certas modalidades, o regime de dosagem da variante de CNP é diariamente por 3 dias seguido por 3 dias de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por uma semana seguido por 3 dias ou uma semana de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por duas semanas seguido por 1 ou duas semanas de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por 3 semanas seguido por 1, 2 ou 3 semanas de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por semana por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 12 semanas seguido por 1, 2, 3 ou 4 semanas de descanso.

[0230] Em modalidades adicionais, a invenção provê um método de tratamento de uma condição ou distúrbio responsivo a CNP compreendendo administrar um peptídeo CNP ou variante a um indivíduo e monitoramento do nível de pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem no indivíduo (por exemplo, em uma amostra biológica de um indivíduo), onde um aumento ou diminuição no nível do biomarcador associado a osso ou cartilagem indica um efeito terapêutico do peptídeo CNP ou variante sobre o indivíduo. Em algumas modalidades, quando o nível de um biomarcador aumenta em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem, um aumento no nível deste biomarcador indica um efeito terapêutico do peptídeo CNP ou variante do mesmo no indivíduo. Em outras modalidades, quando o nível de um biomarcador diminui em associação com formação ou crescimento de

osso ou cartilagem, uma diminuição no nível deste biomarcador indica um efeito terapêutico do peptídeo CNP ou variante no indivíduo.

[0231] Em modalidades adicionais, o método terapêutico compreende ainda ajuste da quantidade (ou dose) ou frequência de administração do peptídeo CNP ou variante, onde:

(i) a quantidade (ou dose) ou frequência de administração do peptídeo CNP ou variante é aumentada se o nível do pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem estiver abaixo de um nível alvo, onde o nível do biomarcador aumenta em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem; ou

(ii) a quantidade (ou dose) ou frequência de administração do peptídeo CNP ou variante é diminuída se o nível do pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem estiver acima de um nível alto, onde o nível do biomarcador aumenta em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem; ou

(iii) a quantidade (ou dose) ou frequência de administração do peptídeo CNP ou variante é aumentada se o nível do pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem estiver acima de um nível alvo, onde o nível do biomarcador diminui em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem; ou

(iv) a quantidade (ou dose) ou frequência de administração do peptídeo CNP ou variante é diminuída se o nível do pelo menos um biomarcador associado com osso ou cartilagem estiver abaixo de um nível alvo, onde o nível do biomarcador diminui em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem.

É compreendido que o nível alvo de um biomarcador refere-se ao nível ou faixa de níveis do biomarcador que está associado com efeito terapêutico no indivíduo e/ou efeito benéfico no alívio ou melhora dos sintomas do distúrbio ou condição. Em certas modalidades, um nível de um biomarcador acima ou abaixo de um nível alvo pode ser

prejudicial para o indivíduo.

[0232] Em outras modalidades, a invenção compreende um método para avaliação do efeito de administração de um peptídeo CNP ou variante sobre a formação ou crescimento de osso ou cartilagem. Em uma modalidade, o método provê ensaio ou medição do nível de pelo menos um biomarcador associado com osso ou cartilagem em um indivíduo que recebeu um peptídeo CNP ou variante a fim de avaliar o efeito do peptídeo CNP ou variante sobre formação e crescimento de osso e cartilagem *in vivo*. Em uma modalidade relacionada, um aumento no nível do pelo menos um biomarcador associado com osso ou cartilagem pode indicar que a administração de um peptídeo CNP ou variante tem efeito positivo sobre formação ou crescimento de osso ou cartilagem e é um tratamento útil para displasias esqueléticas e outras doenças ou distúrbios relacionados a osso ou cartilagem associados com atividade de CNP menor. Biomarcadores associados a osso ou cartilagem exemplares incluem, mas não estão limitados a, CNP (por exemplo, nível endógeno de CNP-22 ou CNP-53), cGMP, osteocalcina, antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), polipeptídeos de pró-colágeno tipo I (PINP) e seus fragmentos, colágeno tipo I e seus fragmentos, pró-peptídeos de colágeno tipo II e seus fragmentos, colágeno tipo II e seus fragmentos, sulfato de agrecano condroitina e fosfatase alcalina.

[0233] Em modalidades adicionais, a invenção compreende um método de avaliação do efeito de um peptídeo CNP ou variante sobre o nível de pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem em um indivíduo compreendendo ensaio ou medição do nível do biomarcador associado a osso ou cartilagem em uma amostra biológica de um indivíduo que recebeu administração de um peptídeo CNP ou variante. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administração do peptídeo CNP ou variante ao indivíduo antes do ensaio

ou medição do nível do biomarcador associado a osso ou cartilagem.

[0234] Em certas modalidades, o pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem é selecionado do grupo consistindo em CNP (por exemplo, nível endógeno de CNP-22 ou CNP-53), cGMP, pró-peptídeos de colágeno tipo II e seus fragmentos, colágeno tipo II e seus fragmentos, osteocalcina, antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), pró-peptídeos de pró-colágeno tipo I (PINP) e seus fragmentos, colágeno tipo I e seus fragmentos, sulfato de agrecano condroitina e fosfatase alcalina.

[0235] Em algumas modalidades dos métodos (por exemplo, métodos terapêuticos, de diagnóstico e ensaio) relacionando-se a biomarcadores associados a osso ou cartilagem, o peptídeo CNP ou variante é CNP-22, CNP-53 ou qualquer um dos peptídeos CNP e variantes descritos aqui. Em certas modalidades de tais métodos, o peptídeo CNP ou variante não é CNP-22 ou CNP-53.

[0236] Em outras modalidades, a invenção provê um método para produção recombinante de uma variante de CNP compreendendo cultura em um meio de uma célula hospedeiro compreendendo um polinucleotídeo codificando um peptídeo variante de CNP ligado a um polinucleotídeo codificando um peptídeo ou proteína clivável, sob condições que resultam em expressão de um polipeptídeo de fusão codificado pelos polinucleotídeos. Em uma modalidade relacionada, a célula hospedeiro é transformada com um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando um peptídeo variante de CNP ligado a polinucleotídeo codificando um peptídeo ou proteína clivável.

[0237] Em uma modalidade, o vetor é um plasmídeo. Em outra modalidade, o plasmídeo é selecionado do grupo consistindo em pET-21a, pJexpress, pET-31b, pET-15b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pQE-30, pET-SUMO, pET-22b e pTYB11.

[0238] Em certas modalidades, o peptídeo ou proteína clivável

compreende um polipeptídeo que é selecionado do grupo consistindo em um marcador de histidina, fator de transcrição humano TAF12, cetoesteroide isomerase, proteína de ligação à maltose, β-galactosidase, glutationa-S-transferase, tiorredoxina, domínio de ligação à quitina e mutação de BMP-2 ou seus fragmentos.

[0239] Em uma modalidade relacionada, o peptídeo ou proteína clivável é clivado por um agente de clivagem. Em algumas modalidades, o agente de clivagem é selecionado do grupo consistindo em ácido fórmico, brometo de cianogênio (CNBr), hidroxilamina, autoclivagem de proteína, Fator Xa, enterocinase, ProTEV e protease de SUMO. Agentes de clivagem exemplares adicionais incluem, mas não estão limitados a, paládio, clostripaína, trombina, quimiotripsina, tripsina, proteases tipo tripsina, carboxipeptidase, enteropeptidase, protease de Kex 2, protease de Omp T, subtilisina, protease de V8, protease de HIV, protease de rinovírus, protease de furilisina, protease de IgA, protease de Pace humana, colagenase, protease de Nia, protease 2Apro de poliovírus, protease 3C de poliovírus, genenase, furina, elastase, Proteinase K, pepsina, renina (quimiosina), proteases aspárticas microbianas, papaína, calpaína, quimiopapaína, ficina (ficaína), bromelaina (bromelase), catespisina B, caspases, termolisina, Endoprotease Arg-C, Endoprotease Glu-C, Endoprotease Lys-C, calicreína e plasmina.

[0240] Em certas modalidades, o polipeptídeo de fusão é expresso como uma proteína solúvel ou como um corpo de inclusão. Em uma modalidade relacionada a invenção compreende isolamento do polipeptídeo de fusão expresso da célula hospedeiro ou meio de cultura. Em uma modalidade adicional, o polipeptídeo de fusão isolado é contatado com um agente de clivagem conforme aqui descrito.

[0241] Em uma modalidade, a invenção provê uma célula hospedeiro bacteriana compreendendo um vetor de expressão, o dito vetor compreendendo um polinucleotídeo codificando um peptídeo variante

de CNP ligado a um polinucleotídeo codificando um peptídeo ou proteína clivável. Em algumas modalidades, o peptídeo ou proteína clivável é selecionado do grupo consistindo em um marcador de histidina, fator de transcrição humano TAF12, isomerase de cetoesteroide, proteína de ligação à maltose, β-galactosidase, glutationa-S-transferase, tiorredoxina, domínio de ligação à quitina e mutação de BMP-2 ou seus fragmentos.

[0242] Em outra modalidade, a célula hospedeiro é uma bactéria, tal como *E. coli.* Em uma modalidade relacionada, a célula de *E. coli* é selecionada do grupo consistindo em BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [também chamada C41(DE3)], C43 [também chamada C43(DE3)], Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX e Tuner(DE3). Em uma modalidade adicional, a célula hospedeiro compreende um vetor conforme acima descrito. Em algumas modalidades, a célula hospedeiro é transformada com o vetor antes da cultura da célula.

[0243] Em certas modalidades, é compreendido que a célula hospedeiro é cultivada em um meio sob condições adequadas para expressão de um polipeptídeo de fusão codificado pelos polinucleotídeos. Em uma modalidade, o polipeptídeo de fusão é expresso como uma proteína solúvel ou um corpo de inclusão. Em uma modalidade relacionada, o polipeptídeo de fusão expresso é isolado da célula hospedeiro ou meio de cultura. Em outra modalidade, o polipeptídeo de fusão isolado é contatado com um agente de clivagem conforme aqui descrito.

Breve Descrição das figuras

[0244] A **figura 1** mostra expressão de proteínas de fusão de CNP em *E. coli* (figura 1A: Tingimento com Coomassie blue, figura 1B: *Western blot*). M: marcador de proteína; T: lisatos de célula totais; S: sobrenadantes solúveis; P: CNP22 2 ug; KSI: expressão da proteína de

fusão KSI-CNP (M/N) (insolúvel); N: lisatos totais de proteína de fusão KSI-CNP induzidos por Um; KSI': expressão da proteína de fusão KSI-P-CNP (insolúvel); Trx: expressão da proteína de fusão Trx-P-CNP (solúvel); MBP: expressão da proteína de fusão MBP-P-CNP (solúvel); TAF: expressão da proteína de fusão TAF-P-CNP (Insolúvel) (BL21); TAF': expressão da proteína de fusão TAF-P-CNP (insolúvel) BL21 (DE3), onde CNP é Gly-CNP37.

[0245] A **figura 2** mostra clivagem com ácido fórmico de corpos de inclusão TAF-CNP. M: Marcador de proteína; 1: controle positivo de Gly-CNP37; 2: corpos de inclusão TAF-CNP não clivados; 3: corpos de inclusão TAF-CNP clivados com ácido fórmico, onde CNP é Gly-CNP37.

[0246] As **figuras 3A-E** mostram expressão de proteínas de fusão de CNP em *E. coli*; M: marcador de proteína; Tu: lisatos de célula induzidos por un totais; Su: sobrenadantes solúveis induzidos por un; T: lisatos de célula induzidos totais; S: sobrenadantes solúveis; C1: CNP22; C: Gly-wtCNP37 ("CNP38"); P: péletes insolúveis. **A**: Expressão da proteína de fusão KSI: KSI-CNP38(M/N) (Insolúvel); KSI': expressão da proteína de fusão KSI-Pro-CNP38 (Pro-Gly-wtCNP37 é chamada "Pro-CNP38") (Insolúvel); Trx: expressão da proteína de fusão Trx-Pro-CNP38 (Solúvel); MBP: expressão da proteína de fusão MBP-Pro-CNP38 (Solúvel); TAF: Expressão da proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 (Insolúvel) a partir da célula BL21; TAF': Expressão da proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 (Insolúvel) a partir da célula BL21(DE3). **B**: Expressão das proteínas de fusão TAF-Pro-CNP37 e BMP-Pro-CNP37. **C**: Expressão das proteínas de fusão BMP-Pro-CNP38 e proteína BMP. D: TAF-Pro-HSA-CNP ("Pro-GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (SEQ ID Nº:188) é chamada expressão da proteína de fusão "Pro-HSA-CNP"). **E**: Expressão da proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 e proteína TAF.

[0247] As **figuras 4A-C** mostram clivagem de ácido fórmico de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38. **A**: clivagem com ácido fórmico 50% de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38. M: marcador de proteína; **U:** corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 não clivados; 25°C, 37°C, 42°C, 55°C: corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram clivados em ácido fórmico 50% a 25°C, 37°C, 42°C ou 55°C por 24 horas. 37°C-S e 55°C-S: sobrenadantes solúveis das reações de clivagem a 37°C e 55°C neutralizados com NaoH 10N e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. **B**: clivagem com ácido fórmico 10% e 2% de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38. M: marcador de proteína; U: corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 não clivados; **C**: TAF-Pro-CNP38 clivado com ácido fórmico; S: sobrenadante solúvel após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos sem neutralização; P: pélete insolúvel após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos sem neutralização. **C**: análise LC/MS de produtos clivados com ácido fórmico a 2% e 10% de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38.

[0248] As **figuras 5A-C** mostram clivagem com ácido fórmico de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 em temperatura e tempo diferentes de clivagem com ácido fórmico. M: marcador de proteína; C: controle positivo Gly-wtCNP37 ("CNP38"); U: corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 não clivados. A: TAF-Pro-CNP38 clivado com ácido fórmico a 42°C, 55°C ou 70°C por 6, 24 ou 48 horas. **B**: TAF-Pro-CNP38 clivado com ácido fórmico a 55°C, 60°C, 65°C ou 70°C por 17 ou 24 horas. **C**: análise de LC/MS de produtos clivados com ácido fórmico 2% de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38.

[0249] A **figura 6** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) para a expressão de proteína de fusão TAF-CNP34. M: marcador de proteína; C: controle [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: lisatos de célula totais; S: sobrenadante; TI: lisatos de célula totais induzidos; SI: induzido pelo sobrenadante.

[0250] A **FIGURA 7** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) para a expressão de proteínas de fusão TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38, TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38 e TAF-Pro-CNP53, onde "Pro-CNP38" significa Pro-Gly-CNP37, M: marcador de proteína; C: [Gly-CNP37 ("CNP38")] controle; T: lisatos de célula totais; TI: induzido por lisatos de célula totais; S: sobrenadante; SI: induzido por sobrenadante.

[0251] A **figura 8** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) dos produtos de clivagem com ácido fórmico das proteínas de fusão TAF-CNP34 e TAF-Pro-CNP53, M: marcador de proteína; P: controle positivo [Gly-CNP37 ("CNP38")]; U: não clivado; C: clivado; CS: sobrenadante clivado; CP: pélete clivado.

[0252] A **figura 9** é um cromatograma de LC/MS mostrando o pico para CNP34 após clivagem com ácido fórmico de TAF-CNP34.

[0253] A **figura 10** é um cromatograma de LC/MS mostrando o pico para Pro-CNP53 após clivagem com ácido fórmico de TAF-Pro-CNP53.

[0254] A **figura 11** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) para a expressão de proteínas de fusão TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38 e TAF(4D/4E)-Pro-CNP38, onde "Pro-CNP38" significa Pro-Gly-CNP37. M: marcador de proteína; C: controle [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: lisatos de célula totais; TI: induzido por lisatos de célula totais; SI: induzido por sobrenadantes.

[0255] A **figura 12** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) dos produtos de clivagem com ácido fórmico das proteínas de fusão TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 e TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38, onde "Pro-CNP38" significa Pro-Gly-CNP37. M: marcador de proteína; P: controle positivo [Gly-CNP37 ("CNP38")]; U: não clivado; C: clivado; CS: sobrenadante clivado; CP: pélete clivado.

[0256] A **figura 13** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie

blue) dos produtos de clivagem com ácido fórmico das proteínas de infusão TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 e TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38, onde "Pro-CNP38" significa Pro-Gly-CNP37. M: marcador de proteína; P: controle positivo [Gly-CNP37 ("CNP38")]]; U: não clivado; C: clivado; CS: sobrenadante clivado; CP: pélete clivado.

[0257] A **figura 14** é um *Western blot*, usando um anticorpo anti-CNP, de uma proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 produzida em uma fermentação de 10L de células BL21(DE3), onde as células foram induzidas em $OD_{600}$=64 h e hora 17 e e "Pro-CNP38" significa Pro-Gly-CNP37.

[0258] A **figura 15** é um SDS-PAGE (tingimento com Coomassie blue) de frações de eluato de cromatografia de coluna de troca de cátion SP-Sepharose de um produto Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") mais bruto. A: corpo de inclusão TAF-Pro-CNP38 (IB) em água; B: IB em formato; C: IB em formato, neutralizado; D: pélete neutralizado; E: sobrenadante neutralizado; F: carga TMAE Hi-CAP; G: fluxo de TMAE Hi-CAP/carga de SP-Sepharose; H: fluxo de SP-Sepharose; frações de eluato de SP-Sepharose 1-47: 10 uL/faixa.

[0259] A **figura 16** mostra o grau de resistência de conjugados de CNP22 PEGuilados N-terminais à endopeptidase neutra (NEP) *in vitro*.

[0260] A **figura 17** mostra o grau de resistência à NEP de variantes de CNP tendo uma extensão de aminoácido no terminal amino ["CNP27" é GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36)].

[0261] A **figura 18** ilustra o grau de resistência à NEP de CNP17 e GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27") (SEQ ID Nº: 36) PEGuilados N-terminais.

[0262] A **figura 19** ilustra o grau de resistência à NEP de wtCNP22 e variantes de CNP Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA" nas figuras) (SEQ ID Nº: 144) e PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12" nas figuras) (SEQ ID Nº: 36).

[0263] A **figura 20** mostra a habilidade de variantes de CNP tendo uma extensão de aminoácido N-terminal em estimular produção de cGMP em células NIH3T3 *in vitro*. Os resultados são relativos ao nível de cGMP produzido na presença de 1 uM de CNP22. "CNP27" é GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0264] A **figura 21** mostra a habilidade de CNP17 e GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27") peguilados (SEQ ID Nº: 36) em estimular a produção de cGMP em células NIH3T3.

[0265] A **figura 22** ilustra os efeitos de PEGuilação N-terminal de CNP22 em produção de cGMP.

[0266] A **figura 23** ilustra a produção de cGMP induzida por wtCNP22 e variantes de CNP Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA") (SEQ ID Nº: 144), wtCNP29 e PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36) em células NIH3T3.

[0267] As **figuras 24A** e **B** mostram que CNP-22 e Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") estimularam a produção de cGMP através de NPR-B com curvas de dose-resposta similares, e a um grau muito maior do que através de NPR-A, e exibiram um perfil similar para seletividade de NPR-B vs. NPR-C em ensaios de competição de sinalização.

[0268] A **figura 25** demonstra que exposição de células de condrossarcoma de rato a CNP22 uma hora uma vez por dia ou duas horas uma vez por dia tem eficácia substancialmente similar em reversão de parada induzida por FGF2 de crescimento de condrócito que exposição contínua a CNP22.

[0269] As **figuras 26A** e **B** mostram resultados de um estudo de dose-resposta de efeitos CNP22 sobre células de condrossarcoma de rato (RCS) paradas por FGF2.

[0270] As **figuras 27A-D** mostram adição de CNP22 a células RCS paradas por FGF2 aumenta a síntese de matriz e inibe parcial-

mente FGF2, conforme avaliado através de incorporação de $^{35}$S-sulfato e $^{3}$H-Pro na e/ou diminuição da matriz. Painéis A e C, síntese: B e D, degradação; A e B, medição de $^{35}$S; C e D, medição de $^{3}$H. Diferenças estatisticamente significantes são destacadas (ANOVA; *p<0,05, **p<0,01).

[0271] As figuras **28A-C** mostram os níveis de produção de agrecano e fibronectina (mRNA, painéis A e C, e proteína, painel B) em células RCS cultivada s com FGF2 e CNP22.

[0272] A **figura 29** mostra a eficácia de CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22 (K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº:36) em estimulação de crescimento longitudinal de fêmur do tipo selvagem em um modelo de órgão de camundongo *ex vivo*.

[0273] A **figura 30** mostra crescimento de osso longitudinal de tíbias de camundongo do tipo selvagem de 2-3 dias de vida com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) a cada dois dias. Os resultados são normalizados para medições antes do tratamento (dia 0). Os dados são representados como média ± SEM (n=8).

[0274] A **figura 31** mostra crescimento de osso longitudinal de tíbias de camundongo FGFR3$^{ach}$ acondroplásticos de 2-3 dias de vida tratados com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) a cada dois dias. Os resultados são normalizados para medições antes do tratamento (dia 0). Os dados são representados como média ± SEM (n=7-8).

[0275] A **figura 32** mostra crescimento de osso longitudinal de fêmures de camundongo tipo selvagem de 2-3 dias de vida tratados com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) a cada dois dias. Os resultados são normalizados para medição antes do tratamento (dia 0). Os dados são representados como média ± SEM (n=8).

[0276] A **figura 33** mostra crescimento ósseo longitudinal de fêmures de camundongo FGFR3$^{ach}$ de 2-3 dias de vida tratados com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) a cada dois dias. Os resultados são normalizados para medições antes do tratamento (dia 0). Os dados são representados como média ± SEM (n=3-7).

[0277] As **figuras 34A-I** mostram biodistribuição de CNP37 em fêmures de camundongo FGFR3$^{ach}$ tratados *ex vivo* a cada dois dias. Os painéis A-C ilustram distribuição em fêmures distais, os painéis D-F ilustram distribuição em condrócitos articulares e os painéis G-I ilustram distribuição em condrócitos hipertróficos.

[0278] As **figuras 35A-C** mostram a celularidade de colunas de proliferação em placas de crescimento após tratamento de fêmures de camundongo do tipo selvagem e FGFR3$^{ach}$ com CNP22 ou CNP37 a cada dois dias por 8 dias. (A) nenhum tratamento, (B) números de célula por coluna após tratamento, (C) estudos morfológicos após tratamento. Os painéis nas figuras 35C(i) a C(vi) correspondem à ordem de amostra mostrada na figura 35B. Os dados são representados como média ± SEM (n=4-8).

[0279] As **figuras 36A-C** mostram hipertrofia de condrócito após tratamento *ex vivo* de fêmures de camundongo do tipo selvagem e FGFR3$^{ach}$ com CNP22 ou CNP37 a cada dois dias por 8 dias. (A) nenhum tratamento, (B) tamanho da célula após tratamento, (C) estudos morfológicos após tratamento. Os painéis na figura 36(i) a C(vi) correspondem à ordem da amostra mostrada na figura 36B. Os dados são representados como média ± SEM (n=4-9).

[0280] As **figuras 37A-I** mostram a biodistribuição de CNP37 em tíbias de camundongo FGFR3ach tratados *in vivo*. Os painéis A-C mostram distribuição em fêmures distais, os painéis D-F ilustram distribuição em condrócitos articulares e os painéis G-I ilustram a distri-

buição de condrócitos hipertróficos.

[0281] As **figuras 38A-C** ilustram os efeitos *in vivo* de CNP37 sobre a placa de crescimento de tíbia de camundongo $FGFR3^{ach}$: (A) espessura da placa de crescimento total, (B) espessura da zona de proliferação e (C) espessura da zona hipertrófica. Os dados são representados como média ± SEM (n=7-15).

[0282] A **figura 39** mostra os níveis de cGMP em meio condicionado de fêmures de camundongo do tipo selvagem tratados *ex vivo* com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº: 36) ($p < 0,01$).

A **figura 40** mostra níveis de cGMP em meio condicionado de fêmures de camundongo $FGFR3^{ach}$ *ex vivo* com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ($p < 0,01$).

[0283] A **figura 41** mostra níveis de cGMP em meio condicionado de tíbias de camundongo do tipo selvagem *ex vivo* com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ($p < 0,01$).

[0284] A **figura 42** mostra níveis de cGMP em meio condicionado de tíbias de camundongo $FGFR3^{ach}$ tratados *ex vivo* com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ($p < 0,01$).

[0285] A **figura 43** demonstra que exposição *ex vivo* de fêmures de camundongo do tipo selvagem e $FGFR3^{ach}$ a CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) aumentou os níveis de colágeno tipo II clivado no meio condicionado ($p<0,05$).

[0286] A **figura 44** mostra a região hipertrófica de ossos femurais isolados de camundongos do tipo selvagem e camundongos $FGFR3Y^{367C}$ (um modelo de camundongo de acondroplasia severa) e tratados *ex vivo* com veículo ou 1 uM de Pro-Gly-CNP37 ("ProCNP38") por 6 dias, demonstrando que tratamento com Pro-Gly-CNP37 resultou em aumento em crescimento e expansão de osso em placa de crescimento.

[0287] A **figura 45** mostra que CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) intravenosamente (i.v.) administrados a ratos têm uma meia-vida muito mais longa e uma biodisponibilidade muito maior no plasma do que CNP22.

[0288] A **figura 46** ilustra que PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) subcutaneamente (s.c.) administrado a ratos também tem uma meia-vida muito mais longa e uma biodisponibilidade muito maior no plasma do que CNP22.

[0289] A **figura 47** demonstra que CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) administrados i.v. estimulam um nível muito maior de produção de cGMP em ratos do que CNP22.

[0290] A **figura 48** mostra que PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) e, a um grau menor, CNP37 são substancialmente mais eficazes na estimulação de produção de cGMP em ratos do que CNP22.

[0291] A **figura 49** mostra as medições de peso corporal de camundongos do tipo selvagem tratados com Gly-CNP37 ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0292] A **figura 50** mostra medições de comprimento de cauda de camundongos do tipo selvagem tratados com Gly-CNP37 ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0293] A **figura 51** ilustra o efeito de tratamento de camundongos $FGFR3^{ach}$ com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o peso do corpo ($p=0,02$, teste t de 1 variável, variância desigual).

[0294] A **figura 52** mostra o efeito de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o comprimento da cauda em camundongos $FGFR3^{ach}$.

[0295] As **figuras 53A** e **B** mostram o efeito de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o comprimento

de ossos longos distais (A, ulna; B, tíbia) em camundongos FGFR3$^{ach}$ ($p<0,01$, teste de 1 variável, variância desigual).

[0296] As figuras **54A** e **B** mostram o efeito de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o comprimento de ossos proximais (A, húmero; B, fêmur) em camundongos FGFR3$^{ach}$ ($p<0,01$, teste de 1 variável, variância desigual).

[0297] A **figura 55** ilustra que administração de CNP37 corrige a rizomelia (desproporção do comprimento de membros proximais) conforme avaliado através da razão de fêmur:tíbia observada em camundongos FGFR3$^{ach}$ ($p<0,01$, teste de 1 variável, variância desigual).

[0298] A **figura 56** mostra o efeito de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o comprimento da cabeça em camundongos FGFR3$^{ach}$ ($p<0,01$, teste de 1 variável, variância desigual).

[0299] A **figura 57** mostra que tratamento de camundongos FGFR3$^{ach}$ com CNP37 aumenta o tamanho do meato auditivo externo (*External Auditory Meatus*) (EAM) ($P=0,03$, teste t de uma variável, variância desigual).

[0300] A **figura 58** mostra o efeito de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sobre o comprimento espinhal em camundongos acondroplásticos, expresso como extensão de corpos vertebrais (por exemplo, vertebral lombar 5).

[0301] A **figura 59** mostra que tratamento de camundongos FGFR3$^{ach}$ com CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº:36) resulta em níveis de cGMP no plasma aumentados 15 min pós-dose.

[0302] A **figura 60** ilustra os níveis no soro de colágeno tipo II clivado em camundongos FGFR3$^{ach}$ tratados 5 semanas com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0303] A **figura 61** mostra os níveis no soro de osteocalcina em

camundongos FGFR3$^{ach}$ tratados 5 semanas com CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0304] A **figura 62** mostra os níveis no plasma de cGMP 15 minutos pós-dose de camundongos do tipo selvagem tratados com Gly-CNP37 ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ($p < 0,05$).

[0305] A **figura 63** mostra os níveis no soro de colágeno tipo II clivado em camundongos do tipo selvagem tratados 5 semanas com Gly-CNP37 ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0306] As **figuras 64-66** mostram os níveis de cGMP, colágeno tipo II clivado e fosfatase alcalina após administração de veículo ou 20 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") a camundongos do tipo selvagem.

[0307] As **figuras 67** e **68** mostram níveis de colágeno tipo II clivado e fosfatase alcalina total após administração de veículo ou Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") sob regimes de dosagem diferentes.

[0308] A **figura 69** ilustra o aumento relativo em peso do corpo de animais tratados com Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") e veículo em dois estudos separados (S1 e S2) e Dia 37 vs. Dia 1.

[0309] As **figuras 70A** e **70B** mostram mudanças em densidade mineral óssea (A) e teor de mineral ósseo (B) após administração de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38").

[0310] A **figura 71** mostra os níveis de cGMP no plasma 15 min após a última dose subcutânea de variante de CNP, Dia 36, onde Gly-wtCNP37 é "CNP38", Pro-Gly-wtCNP37 é "Pro-CNP38" e GHKSE-VAHRFK-wtCNP27(SEQ ID Nº: 144) é "HSA-CNP27" nas figuras 71-73.

[0311] A **FIGURA 72** mostra níveis no soro de colágeno tipo II clivado de camundongos tratados com Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 ou GHKSEVAHRFK-CNP27 (SEQ ID Nº: 144).

[0312] A **figura 73** mostra níveis no soro de fosfatase alcalina de

camundongos tratados com Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 ou GHKSE-VAHRFK-CNP27 (SEQ ID Nº: 144).

[0313] As **figuras 74A** e **B** mostram dessensibilização da resposta de cGMP após tratamento agudo (A) ou crônico (B) com 1 uM de Gly-CNP37.

[0314] A **figura 75A** demonstra que o tratamento diário de camundongos do tipo selvagem com 200 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") por 8 dias não dessensibilizou a resposta de cGMP. A **figura 75B** mostra que tratamento dos camundongos com 200 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 uma vez por dia por dois dias con*sec*utivos potencializou a resposta de cGMP.

[0315] As **figuras 76A-D** mostram que tratamento de camundongos do tipo selvagem com 200 nmol/kg de Gly-CNP37 estimulou a *se*-*c*reção de cGMP em fêmures distais (cartilagem e osso) (A), córtices femorais (osso) (B), parte externa do ouvido (cartilagem) (C) e rim (D). As **figuras 76E-H** mostram que tecidos do fígado (E), coração (F), pulmão (G) e cérebro (H) não exibiram *sec*reção de cGMP apreciável em resposta a Gly-CNP37 com relação ao controle veículo nos pontos de tempo estudados.

[0316] As **figuras 77-82** mostram resultados de um estudo em andamento em macacos cinomólogos juvenis normais subcutaneamente injetados diariamente com veículo ou 10 ou 36 ug/kg de Pro-Gly-CNP37. Ambas as doses de Pro-Gly-CNP37 têm largura da placa de crescimento aumentada (figura 77), comprimentos da tíbia direita e esquerda aumentados (figuras 78A e B), comprimento da perna aumentado (figura 79), comprimento do braço aumentado (figura 80), comprimento do corpo aumentado (figura 81) e aumentaram o nível no soro de fosfatase alcalina (figura 82).

[0317] A **figura 83** mostra o gráfico observado da constante de taxa de degradação ($K_{obs}$) vs. pH em pH 3-8 e 5°C, 25°C e 40°C para

formulações de Gly-CNP37.

Descrição Detalhada da Invenção

[0318] A presente invenção refere-se a novas variantes de CNP tendo afinidade reduzida para NEP e/ou NPR-C e susceptibilidade à clivagem por NEP e/ou excreção por NPR-C reduzidas, composições farmacêuticas compreendendo tais variantes de CNP e métodos de uso de tais variantes de CNP para tratar distúrbios responsivos a CNP incluindo, mas não limitado a, distúrbios relacionados ao osso tal como acondroplasia e distúrbios associados com células e tecidos de músculo liso vascular.

A. Definições

[0319] A menos que de outro modo declarado, os termos que seguem usados no presente pedido, incluindo o relatório e reivindicações, têm as definições dadas abaixo.

[0320] Como usado no relatório e nas reivindicações apensas, os artigos indefinidos "um, uma" e "uns, umas" e os artigos definidos "o, a" e "os, as" incluem referentes tanto no plural quanto no singular a menos que o contexto dite claramente o contrário.

[0321] O termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa um erro aceitável para um valor particular conforme determinado por um versado comum na técnica, que depende em parte de como o valor é medido ou determinado. Em certas modalidades, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de 1, 2, 3 ou 4 desvios padrão. Em certas modalidades, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa dentro de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, ou 0,05% de um dado valor ou faixa. Sempre que o termo "cerca de" ou "aproximadamente" preceder o primeiro valor numérico em uma série de dois ou mais valores numéricos, é compreendido que o termo "cerca de" ou "aproximadamente" se aplica a cada um dos valores numéricos na série.

[0322] Os termos "temperatura ambiente" e "temperatura da sala" são usados aqui intercomutavelmente e referem-se à temperatura do ambiente ao redor (por exemplo, a sala onde uma reação é conduzida ou uma composição é armazenada). Em certas modalidades, temperatura ambiente ou temperatura da sala está em uma faixa de a partir de cerca de 15°C a cerca de 28°C ou de a partir de cerca de 15°C a cerca de 25°C ou de a partir de cerca de 20°C a cerca de 28°C ou de a partir de cerca de 20°C a cerca de 25°C ou de a partir de cerca de 22°C a cerca de 28°C ou de a partir de cerca de 22°C a cerca de 25°C. Em outras modalidades, temperatura ambiente ou temperatura da sala é cerca de 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 ou 28°C.

[0323] Definição de termos da química padrão pode ser encontrada em trabalhos de referência, incluindo Carey e Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edição, Vols. A e B (Plenum Press, New York 1992). A prática da presente invenção pode empregar, a menos que de outro modo indicado, certos métodos convencionais de química orgânica sintética, espectrometria de massa, cromatografias preparativa e analítica, química de proteína, bioquímica, tecnologia de DNA recombinante e farmacologia, dentro da habilidade da técnica. Vide, por exemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures e Molecular Properties* (W.H. Freeman e Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4ª Edição, 2004); Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 18ª Edição (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

[0324] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados aqui, seja *supra* ou *infra*, são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade:

[0325] As abreviações de aminoácido que seguem são usadas em todo o texto:

| | |
|---|---|
| Alanina: Ala (A) | Arginina: Arg (R) |
| Asparagina: Asn (N) | Ácido aspártico: Asp (D) |
| Cisteína: Cys (C) | Glutamina: Gln (Q) |
| Ácido glutâmico: 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) | Triptofano: Trp (W) |
| Tirosina: Tyr (Y) | Valina: Val (V) |

[0326] "Polipeptídeo" e "proteína" referem-se a um polímero composto de resíduos de aminoácido, variantes estruturais de ocorrência natural relacionadas e seus análogos de ocorrência não natural sintéticos, ligado através de ligações de peptídeo ou isósteres ligados a peptídeo. Os polipeptídeos sintéticos podem ser sintetizados, por exemplo, usando um sintetizador de polipeptídeo automático. Os termos "polipeptídeo" e "proteína" não são limitados a um comprimento mínimo do produto. O termo "proteína" tipicamente refere-se a polipeptídeos grandes. O termo "peptídeo" refere-se tipicamente a polipeptídeos curtos. Desta maneira, peptídeos, oligopeptídeos, dímeros, multímeros e similar estão incluídos na definição. Ambos as proteínas de comprimento integral e seus fragmentos estão compreendidos na definição. Os termos "polipeptídeo" e "proteína" também incluem modificações pós-expressão do polipeptídeo ou proteína, por exemplo, glicosilação, acetilação, fosforilação e similar. Ainda, para propósitos da presente invenção, um "polipeptídeo" pode incluir "modificações" tais como deleções, adições, substituições (que podem ser conservativas em natureza ou podem incluir substituições com qualquer um dos 20 ami-

noácidos que estão geralmente presentes em proteínas humanas ou quaisquer outros aminoácidos de ocorrência natural ou não natural ou atípicos), e modificações químicas (por exemplo, adição de ou substituição com peptidomiméticos), na sequência nativa. Essas modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese direcionada a sítio, ou através de modificação química de aminoácidos para remover ou ligar porções de aminoácido, ou podem ser acidentais, tal como através de mutações que surgem com hospedeiros que produzem as proteínas ou através de erros devido à amplificação por PCR.

[0327] Notação convencional é usada aqui para retratar sequências de polipeptídeo: a extremidade esquerda de uma sequência de polipeptídeo é o terminal amino; a extremidade direita de uma sequência de polipeptídeo é o terminal carboxila.

[0328] "Substituição conservativa" refere-se à substituição de um aminoácido em um polipeptídeo com um aminoácidos funcionalmente, estruturalmente ou quimicamente similar natural ou não natural. Em uma modalidade, os grupos que seguem contêm cada um aminoácidos naturais que são substituições conservativas uns dos outros:

(1) Alanina (A) Serina (S), Treonina (T);

(2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E);

(3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

(4) Arginina (R), Lisina (K);

(5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e

(6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

[0329] Em outra modalidade, os grupos que seguem contêm cada um aminoácidos naturais que são substituições conservativas uns dos outros:

(1) Glicina (G), Alanina (A);

(2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (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), Triptofano (W); e

(7) Serina (S), Treonina (T), Cisteína (C).

[0330] Em uma modalidade adicional, os aminoácidos podem ser agrupados conforme mostrado abaixo:

(1) hidrofóbico: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp;

(2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

(5) resíduos que influenciam a orientação da estrutura principal: Gly, Pro; e

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

[0331] Em uma modalidade, os peptídeos ou polipeptídeos descritos aqui são gerados através de meios recombinantes, usando um polinucleotídeo codificando uma variante de CNP. A invenção compreende então polinucleotídeos codificando qualquer uma das variantes de CNP descritas aqui, células hospedeiros ou vetores compreendendo tais polinucleotideos, opcionalmente ligados a sequências de controle de expressão, e métodos de uso de tais polinucleotídeos, vetores ou células hospedeiros para produzir variantes de CNP da invenção. Variantes de CNP expressas por tais polinucleotídeos podem ser produzidas através de métodos incluindo cultivo de células hospedeiro em meio de cultura sob condições adequadas para expressão do polinucleotideo codificando uma variante de CNP e isolamento do produto de expressão das células hospedeiro ou meio de cultura. Produtos de expressão reais podem variar ligeiramente do produto de proteína codificado dependendo de qualquer processamento pós-traducional.

[0332] "Polinucleotídeo" refere-se a um polímero composto de uni-

dades de nucleotídeo. Polinucleotídeos incluem ácidos nucleicos de ocorrência natural, tais como ácido desoxirribonucleico ("DNA") e ácido ribonucleico ("RNA"), bem como análogos de ácido nucleico. O termo "ácido nucleico" refere-se tipicamente a polinucleotideos grandes. O termo "oligonucleotídeo" tipicamente refere-se a polinucleotideos curtos, geralmente não mais do que cerca de 50 nucleotídeos. Será compreendido que quando uma sequência de nucleotídeo é representada por uma sequência de DNA (isto é, A, T, G, C), a sequência de nucleotídeo também compreende uma sequência de RNA (isto é, A, U, G, C) onde "U" substitui "T". "cDNA" refere-se a um DNA que é complementar ou idêntico a um mRNA, ou em forma de filamento simples ou filamento duplo.

[0333] "Sequência de controle de expressão" refere-se a uma sequência de nucleotídeo que regula a expressão de uma sequência de nucleotídeo operativamente ligada à mesma. "Operativamente ligada" refere-se a uma relação funcional entre duas partes onde a atividade de uma parte (por exemplo, a habilidade em regular transcrição) resulta em uma ação sobre a outra parte (por exemplo, transcrição da sequência). Sequências de controle de expressão podem incluir, por exemplo, e sem limitação, sequências de promotores (por exemplo, induzíveis ou constitutivas), aumentadores, terminadores de transcrição, um códon de partida (isto é, ATG), sinais de união para íntrons e códons de parada.

[0334] "Polinucleotídeo recombinante" refere-se a um polinucleotideo tendo sequências que não são naturalmente unidas juntas. Um polinucleotídeo recombinante amplificado ou montado pode ser incluído em um vetor adequado e o vetor pode ser usado para transformar uma célula hospedeiro adequada. Uma célula hospedeiro que compreende o polinucleotideo recombinante é referida como uma "célula hospedeiro recombinante". O gene é então expresso na célula hospe-

deiro recombinante para produzir, por exemplo, um "polipeptídeo recombinante". Um polinucleotídeo recombinante pode servir uma função de não codificação (por exemplo, promotor, origem de replicação, sítio de ligação a ribossomo, etc) também.

[0335] "Quimera" conforme aqui usado refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo compreendendo pelo menos duas sequências de polinucleotideo ou polipeptídeo heterólogas (isto é, derivadas de fontes diferentes ou não associadas uma com a outra como uma sequência de ocorrência natural) que são diretamente ou indiretamente ligadas juntas usando técnicas geralmente conhecidas no campo, por exemplo, expressão recombinante ou reticulação química. Em uma modalidade, a sequência heteróloga pode compreender uma proteína ou peptídeo diretamente ou indiretamente ligado a um peptídeo CNP ou variante, incluindo proteínas ou peptídeos que são cliváveis do peptídeo CNP ou variante. Em uma modalidade relacionada, variantes de CNP são quimeras conforme aqui descrito.

[0336] Em certas modalidades, quimeras incluem proteínas de fusão de CNP compreendendo uma proteína carreadora ou marcador de peptídeo clivável. O termo "proteína carreadora clivável" ou "marcador de peptídeo clivável" refere-se a uma sequência de peptídeo ou polipeptídeo que pode ser fundida, diretamente ou indiretamente através de um ligante, a uma sequência de polipeptídeo heteróloga, e é removível da sequência heteróloga usando um agente que cliva ou separa o peptídeo ou polipeptídeo clivável do polipeptídeo ou proteína heterólogo. Em algumas modalidades, a pro-teína carreadora ou marcador de peptídeo clivável melhora a geração, purificação e/ou detecção da proteína de fusão ou do polipeptídeo heterólogo. Proteínas carreadoras e marcadores de peptídeo cliváveis incluem, mas não estão limitados a, fator de transcrição humano TAF12 (TAF12), cetoesteroide isomerase (KSI), proteína de ligação à maltose (MBP), β-galactosidase

(β-Gal), glutationa-S-transferase (GST), tiorredoxina (Trx), domínio de ligação à quitina (CBD), mutação de BMP-2 (BMPM), SUMO, CAT, TrpE, pro-teína *staphylococcal A*, proteínas *streptococcais,* proteína de ligação a amido, domínio de ligação à celulose de endoglucanase A, domínio de ligação à celulose de exoglucanase Cex, domínio de ligação à biotina, recA, Flag, c-Myc, poly(His), poly(Arg), poly(Asp), poly(Gln), poly(Phe), poly(Cys), proteína verde fluorescente, proteína vermelho fluorescente, proteína amarelo fluorescente, proteína ciano fluorescente, biotina, avidina, estreptavidina, epítopos de anticorpo e seus fragmentos.

[0337] Um "agente de clivagem" é um agente que é útil para clivar ou separar, por exemplo, um peptídeo ou polipeptídeo clivável de um polipeptídeo ou proteína heterólogo. Agentes de clivagem exemplares incluem, mas não estão limitados a, paládio, brometo de cianogênio (CNBr), ácido fórmico, hidroxilamina, clostripaína, trombina, quimiotripsina, tripsina, proteases tipo tripsina, carboxipeptidase, enterocinase (enteropeptidase), protease de Kex 2, protease de Omp T, protease de Fator Xa, subtilisina, proTEV, protease de SUMO, protease de V8, protease de HIV, protease de rinovírus, protease de furilisina, proteases de IgA, protease de Pace humana, colagenase, protease de Nia, protease 2Apro de poliovírus, protease 3C de poliovírus, genenase, furina, elastase, Proteinase K, pepsina, renina (quimiosina), proteases aspárticas microbianas, papaína, calpaína, quimiopapaína, ficina (ficaína), bromelaína (bromelase), catespisina B, caspases, termolisina, Endoprotease Arg-C, Endoprotease Glu-C, Endoprotease Lys-C, calicreína e plasmina.

[0338] Os termos "idêntico" e "identidade" percentual, no contexto de duas ou mais sequências de polinucleotideo ou polipeptídeo, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou têm uma porcentagem especificada de resíduos de nucleotídeos ou

aminoácidos que são iguais, quando comparado com e alinhados para correspondência máxima, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequência que seguem ou através de inspeção visual.

[0339] A expressão "substancialmente homólogo" ou "substancialmente idêntico", no contexto de dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos, geralmente refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade de resíduo de nucleotídeo ou aminoácido, quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequência que seguem ou através de inspeção visual. Em certas modalidades, a homologia ou identidade substancial existe em regiões das sequências que são de pelo menos 25, 50, 100 ou 150 resíduos de comprimento. Em outra modalidade, as sequências são substancialmente homólogas ou idênticas no comprimento de um ou ambos os biopolímeros de comparação.

[0340] Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência age como uma sequência de referência, com a qual sequências de teste são comparadas. Quando usando um algoritmo de comparação de sequência, sequências de teste e referência são inseridas em um computador, coordenadas de subsequência são elaboradas, se necessário, e parâmetros de programa de algoritmo de sequência são elaborados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula a identidade de sequência percentual para a(s) sequência(s) de teste com relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa elaborados.

[0341] Alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, através de algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math*., 2: 482 (1981), através do al-

goritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol*., 48: 443 (1970), através da pesquisa por método de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 (1988), através de implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou através de inspeção visual. Um exemplo de um algoritmo útil é PILEUP, que usa uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol*., 35: 351-360 (1987) e é similar ao método descrito por Higgins & Sharp, *CABIOS*, 5: 151-153 (1989). Outro algoritmo útil para geração de alinhamentos múltiplos de sequências é Clustal W (Thompsone outros, *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680 (1994)). Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinação da identidade de sequência e similaridade de sequência percentuais é o algoritmo BLAST (Altschul *e outros, J. Mol. Biol*., 215: 403-410 (1990); Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89: 10915 (1989); Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5787 (1993)). *Software* para realização de análises BLAST está publicamente disponível do National Center for Biotechnology Information.

[0342] Uma indicação adicional de que duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeos são substancialmente homólogos ou idênticos é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico é imunologicamente reativo cruzado com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, conforme descrito abaixo. Desta maneira, um polipeptídeo é tipicamente substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois polipeptídeos diferem apenas por substituições conservativas. Outra indicação que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam uma para a outra sob condições adstringentes, con-

forme descrito aqui.

[0343] "Substancialmente puro" ou "isolado" significa que uma espécie objeto é a espécie predominante presente (isto é, em uma base molar, mais abundante do que qualquer outra espécie macromolecular individual na composição), e uma fração substancialmente purificada é uma composição onde a espécie objeto compreende pelo menos cerca de 50% (em uma base molar) de todas as espécies de macromolécula presentes. Em uma modalidade, uma composição substancialmente pura significa que a espécie de interesse compreende pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou mais da espécie macromolar presente na composição em uma base molar ou em peso. A espécie objeto é purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição através de métodos de detecção convencionais) se a composição consistir essencialmente em uma espécie macromolecular simples. Espécies solventes, moléculas pequenas (<500 Daltons), estabilizadores (por exemplo, BSA) e espécies de íon elementar não são consideradas espécies macromoleculares para propósitos da presente definição. Em uma modalidade, os compostos da invenção são substancialmente puros ou isolados. Em outra modalidade, os compostos da invenção são substancialmente puros ou isolados com relação aos materiais de partida macromoleculares usados em sua produção. Em ainda outra modalidade, as composições farmacêuticas da invenção compreendem uma variante de CNP substancialmente pura ou isolada misturada com um ou mais excipientes, carreadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis e opcionalmente com outro agente biologicamente ativo.

[0344] "De ocorrência natural" conforme aplicado a um objeto refere-se ao fato de que o objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que está

presente em um organismo (incluindo vírus) e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório é de ocorrência natural. Em uma modalidade, uma substância "de ocorrência natural" é de origem humana.

[0345] "Tipo selvagem" (wt) é um termo que refere-se à forma natural, incluindo sequência, de um polinucleotideo, polipeptídeo ou proteína em uma espécie. Uma forma do tipo selvagem é distinguida de uma forma mutante de um polinucleotídeo, polipeptídeo ou proteína que surge de mutação(ões) genética(s).

[0346] Em uma modalidade, um primeiro polipeptídeo que é um "análogo" ou "variante" ou "derivado" de um segundo polipeptídeo é um polipeptídeo tendo pelo menos cerca de 50%, 60% ou 70% de homologia de sequência, mas menos do que 100% de homologia de sequência, com o segundo polipeptídeo. Tais análogos, variantes e derivados podem ser compreendidos de resíduos de aminoácido de ocorrência não natural, incluindo, sem limitação, homoarginina, ornitina, penicilamina e norvalina, bem como resíduos de aminoácido de ocorrência natural. Tais análogos, variantes ou derivados podem ser também compostos de um ou uma pluralidade de resíduos de D-aminoácido e podem também conter peptidomiméticos ou isósteres ligados a peptídeo tais como ligações não peptídeo entre dois ou mais resíduos de aminoácido ou peptidomiméticos. Em outra modalidade, um primeiro polipeptídeo é um "análogo", "variante" ou "derivado" de um segundo polipeptídeo se o primeiro polipeptídeo não for um produto de clivagem conhecido do segundo polipeptídeo ou não for um precursor conhecido do segundo polipeptídeo, mesmo se o primeiro polipeptídeo tiver 100% de homologia de sequência com o segundo polipeptídeo ou tiver uma sequência do tipo selvagem.

[0347] Em uma modalidade, o termo "derivado de" conforme aqui usado refere-se a um polipeptídeo ou sequência de peptídeo que é

baseado em uma sequência de polipeptídeo ou peptídeo do tipo selvagem ou de ocorrência natural e pode ter uma ou mais deleções, adições e/ou substituições com aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais ou peptidomiméticos. Em uma modalidade, a sequência do derivado compartilha pelo menos cerca de 40%, 50%, 60 ou 70%, mas menos de 100%, de similaridade de sequência com a sequência do tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em outra modalidade, o derivado pode ser um fragmento de um polipeptídeo, onde o fragmento é substancialmente homólogo (por exemplo, pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ou 95% homólogo) com o polipeptídeo do tipo selvagem em um comprimento de pelo menos cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 aminoácidos. Em outra modalidade, um polipeptídeo é "derivado de" um polipeptídeo do tipo selvagem se ele tiver uma porção (por exemplo, um polímero tal como, por exemplo, PEG) diretamente ou indiretamente ligado a ele que não está presente no polipeptídeo do tipo selvagem, mesmo se ambos os polipeptídeos compartilharem 100% de homologia em sua sequência de aminoácido.

[0348] Conforme aqui usado, um polipeptídeo "derivado de NPPC" refere-se a um polipeptídeo derivado do polipeptídeo precursor de peptídeo natriurético C (NPPC), que é um pre-pro polipeptídeo de 126 aminoácidos e que quando da clivagem por fim resulta em wtCNP22. Remoção do peptídeo de sinal do NPPC dá pro-CNP e clivagem adicional pela furina endoprotease gera um peptídeo de 53 aminoácidos ativo (CNP-53), que é *sec*retado e clivado novamente por uma enzima desconhecida para produzir o peptídeo de 22 aminoácidos maduro (CNP ou CNP-22). Desta maneira, o próprio CNP22 é um polipeptídeo "derivado de NPPC" em virtude de ser derivado de NPPC. Em uma modalidade, um polipeptídeo derivado de NPPC é pelo menos cerca de 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% homólogo ao NPPC do tipo selvagem no mesmo número de resíduos de aminoáci-

do. É ainda compreendido que um peptídeo derivado de NPPC pode compreender de a partir de cerca de 1 a cerca de 53 ou 1 a 37 ou 1 a 35 ou 1 a 31 ou 1 a 27 ou 1 a 22 ou 10 a 35 ou cerca de 15 a cerca de 37 resíduos do polipeptídeo de NPPC. Em uma modalidade, um peptídeo derivado de NPPC pode compreender uma sequência 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 ou 53 aminoácidos derivados do polipeptídeo de NPPC.

[0349] O termo "quantidade eficaz" significa uma dosagem suficiente para produzir um resultado desejado em uma condição de saúde, patologia ou doença de um indivíduo ou para um propósito de diagnóstico. O resultado desejado pode compreender um aperfeiçoamento subjetivo ou objetivo no recipiente da dosagem. "Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade de uma gente eficaz para produzir o efeito benéfico pretendido sobre a saúde. Uma quantidade "eficaz" apropriada em qualquer caso individual pode ser determinada por um versado comum na técnica usando experimentação de rotina. Será compreendido que o nível de dose específico e a frequência de dosagem para qualquer paciente particular podem ser variados e vão depender de uma variedade de fatores incluindo a atividade do composto específico empregado; a biodisponibilidade, estabilidade metabólica, taxa de excreção e duração de ação do composto; o modo e o tempo de administração do composto; a idade, peso do corpo, saúde geral, sexo e dieta do paciente; e a severidade da condição particular.

[0350] "Tratamento" refere-se a tratamento profilático ou tratamento terapêutico ou tratamento de diagnóstico. Em certas modalidades, "tratamento" refere-se à administração de um composto ou composição a um indivíduo para propósitos terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico.

[0351] Um tratamento "profilático" é um tratamento administrado a um indivíduo que não exibe sinais de uma doença ou exibe apenas sinais iniciais da doença, para o propósito de diminuição do risco de desenvolvimento de patologia. Os compostos ou composições da invenção podem ser dados como um tratamento profilático para reduzir a probabilidade do desenvolvimento de uma patologia ou para minimizar a severidade da patologia, se desenvolvida.

[0352] Um tratamento "terapêutico" é um tratamento administrado a um indivíduo que exibe sinais ou sintomas de patologia para propósito de diminuição ou eliminação desses sinais ou sintomas. Os sinais ou sintomas podem ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionais ou físicos, subjetivos ou objetivos. Os compostos da invenção podem ser também dados como um tratamento terapêutico ou para diagnóstico.

[0353] "Diagnóstico" significa identificação da presença, extensão e/ou natureza de condição patológica. Métodos de diagnóstico diferem em sua especificidade e sua seletividade. Embora um método de diagnóstico particular possa não prover um diagnóstico definitivo de uma condição, basta se o método prover uma indicação positiva que auxilia em diagnóstico.

[0354] "Biomarcador associado a osso ou cartilagem" ou "marcador associado a osso ou cartilagem" refere-se a um fator de crescimento, enzima, proteína ou outra substância biológica detectável ou porção cujo nível é aumentado ou diminuído em associação com, por exemplo, modificação de cartilagem, formação de cartilagem, crescimento de cartilagem, resabsorção óssea, formação de osso, crescimento de osso ou suas combinações. Tais biomarcadores podem ser medidos antes, durante e/ou após administração de uma variante de CNP conforme aqui descrito. Biomarcadores associados a osso ou cartilagem incluem, mas não estão limitados a, CNP, cGMP, propeptídeos de colágeno tipo II e seus fragmentos, colágeno tipo II e seus

fragmentos, propeptídeos de colágeno tipo I e seus fragmentos, colágeno tipo I e seus fragmentos, osteocalcina, antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), sulfato de condroitina agrecano e fosfatase alcalina. Biomarcadores associados à cartilagem e osso podem ser medidos em qualquer amostra biológica apropriada incluindo, mas não limitado a, tecidos, sangue, soro, plasma, fluido cerebroespinhal, fluido sinovial e urina. Em algumas modalidades, os biomarcadores são medidos em sangue, plasma ou soro de animais sofrendo estudos de eficácia/farmacodinâmica *in vivo* e/ou do meio condicionado de estudos *ex vivo*.

[0355] Em certas modalidades, o nível de pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem é medido e a quantidade ou frequência de administração de variante de CNP administrado a um indivíduo pode ser ajustada de acordo com o nível de biomarcador medido. Em algumas modalidades, o nível de biomarcador está "abaixo de um nível alvo" ou "acima de um nível alvo". Um nível alvo de um biomarcador é um nível ou faixa de níveis do biomarcador nas quais um efeito terapêutico é observado no indivíduo recebendo a variante de CNP. Em certas modalidades, o nível alvo de um biomarcador para um indivíduo tendo um distúrbio ou condição responsivo a CNP é o nível ou faixa de níveis do biomarcador observados em um indivíduo normal, não afetado. Em outras modalidades, para indicar um efeito terapêutico, o nível alvo de um biomarcador não precisa ser equivalente ao nível ou faixa de níveis do biomarcador observados em um indivíduo normal, mas podem estar dentro de, por exemplo, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% ou 5% do nível ou faixa de níveis "normais" do biomarcador observado em um indivíduo não afetado.

[0356] Por exemplo, se o nível de um biomarcador aumenta em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem, o

nível alvo do biomarcador indicando um efeito terapêutico pode ser maior do que o nível do biomarcador em pacientes sofrendo de um distúrbio responsivo a CNP que não foram administrados com uma variante de CNP e pode ser opcionalmente menor do que o(s) nível(eis) "normal(ais)", estar no nível(eis) "normal(ais)" ou acima do nível(eis) "normal(ais)" do biomarcador em indivíduos não sofrendo do distúrbio. Em uma modalidade, se o nível de um biomarcador estiver abaixo de um nível alvo, ele indica um efeito terapêutico inadequado, que pode requerer um aumento na quantidade ou frequência de administração da variante de CNP administrada. Em uma modalidade relacionada, se o biomarcador estiver acima de um nível alvo, ele indica que mais variante de CNP do que necessário foi administrado, o que pode requerer uma diminuição na quantidade ou frequência de administração da variante de CNP administrada.

[0357] Como outro exemplo, se o nível de um biomarcador diminuir em associação com formação ou crescimento de osso ou cartilagem, o nível de direcionamento do biomarcador indicando um efeito terapêutico pode ser menor do que o nível do biomarcador em pacientes sofrendo de um distúrbio responsivo a CNP que não foi administrado com uma variante de CNP e pode ser opcionalmente maior do que o(s) nível(eis) "normal(ais)", estar no(s) nível(eis) "normal(ais)" ou abaixo do(s) nível(eis) "normal(ais)" do biomarcador em indivíduos não sofrendo do distúrbio. Em tal caso, o inverso dos ajustes acima em quantidade e frequência de administração de variante de CNP pode se aplicar.

[0358] "Composição farmacêutica" refere-se a uma composição adequada para uso farmacêutico em indivíduo animal, incluindo humanos e mamíferos. Uma composição farmacêutica compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante de CNP, opcionalmente outro agente biologicamente ativo, e opcionalmente um exci-

piente, carreador ou diluente farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica compreende uma composição compreendendo o(s) ingrediente(s) ativo(s), e o(s) ingrediente(s) inorgânico(s) que forma(m) o carreador, bem como qualquer produto que resulte, diretamente ou indiretamente, da combinação, complexação ou agregação de quaisquer dois ou mais dos ingredientes ou da dissociação de um ou mais dos ingredientes ou de outros tipos de reações ou interações de um ou mais dos ingredientes. Desta maneira, a composição farmacêutica da presente invenção compreende qualquer composição feita através da mistura de um composto da invenção e um excipiente, carreador ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0359] "Carreador farmaceuticamente aceitável" refere-se a qualquer um dos carreadores, tampões farmacêuticos padrão e similar, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução aquosa 5% de dextrose e emulsões (por exemplo, uma emulsão óleo/água ou água/óleo). Exemplos não limitantes de excipientes incluem adjuvantes, ligantes, cargas, diluentes, desintegrantes, agentes emulsificantes, agentes umectantes, lubrificantes, glidantes, agentes adoçantes, agentes saborizantes e agentes de coloração. Carreadores, excipientes e diluentes farmacêuticos adequados são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Ed., (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Carreadores farmacêuticos preferidos dependem do modo de administração pretendido do agente ativo. Modos de administração típicos incluem injeção enteral (por exemplo, oral) ou parenteral (por exemplo, subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intraperitoneal; ou administração tópica, transdermal ou transmucosal).

[0360] Um "sal farmaceuticamente aceitável" é um sal que pode ser formulado em um composto para uso farmacêutico incluindo, mas não limitado a, sais de metal (por exemplo, sódio, potássio, magnésio, cálcio, etc) e sais de amônia ou aminas orgânicas.

[0361] Por "farmaceuticamente aceitável" ou "farmacologicamente aceitável" quer dizer um material que não é biologicamente ou de outra maneira indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo sem causar quaisquer efeitos biológicos indesejáveis ou sem interagir de uma maneira prejudicial com qualquer um dos componentes da composição onde ele está contido ou com quaisquer componentes presentes sobre ou no corpo do indivíduo.

[0362] O termo "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente separadas adequadas como dosagens unitárias para indivíduos humanos e animais, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de um composto da invenção calculada em uma quantidade suficiente para produzir o efeito desejado, opcionalmente em associação com um excipiente, diluente, carreador ou veículo farmaceuticamente aceitável. As especificações para as formas de dosagem unitária novas da presente invenção dependem do composto particular empregado e do efeito a ser obtido e da farmacodinâmica associada com cada composto no hospedeiro.

[0363] "Condições fisiológicas" refere-se a condições no corpo de um animal (por exemplo, um humano). Condições fisiológicas incluem, mas não estão limitadas a, temperatura do corpo e um ambiente aquoso de resistência iônica fisiológica, pH e enzimas. Condições fisiológicas também compreendem condições no corpo de um indivíduo particular que diferem das condições "normais" presentes na maioria dos indivíduos, por exemplo, que diferem da temperatura do corpo humano normal de aproximadamente 37°C ou diferem do pH do sangue humano normal de aproximadamente 7,4.

[0364] Por "pH fisiológico" ou um "pH em uma faixa fisiológica" quer dizer um pH na faixa de aproximadamente 7,0 a 8,0, inclusive, mais tipicamente na faixa de aproximadamente 7,2 a 7,6, inclusive.

[0365] Conforme aqui usado, o termo "indivíduo" compreende

mamíferos e não mamíferos. Exemplos de mamíferos incluem, mas não estão limitados a, qualquer membro da classe mamífero: humanos, primatas não humanos tais como chimpanzés e outras espécies de micos e macacos; animais de fazenda tais como gado, cavalos, ovelha, cabras, suíno; animais domésticos tais como coelhos, cachorros e gatos; animais de laboratório incluindo roedores tais como ratos, camundongos e porquinhos-da-índia e similar. Exemplos de não mamíferos incluem, mas não estão limitados a, aves, peixe e similar. O termo não denota uma idade ou gênero particular.

[0366] Os termos "polietileno glicol", "PEG", "óxido de polietileno" e "PEO" são usados intercomutavelmente aqui a menos que de outra maneira indicado. Um peptídeo CNP (CNP22 ou uma variante do mesmo) conjugado através de um grupo amino a um polímero "PEOn" associado com o número n em geral tem a fórmula: $CH_3$–[–O–$CH_2CH_2$–]$_n$–C(=O)–NHR, onde n é o número de unidades de óxido de etileno e R denota o resto do peptídeo. O polímero "PEOn" pode ter opcionalmente um grupo alquileno, $(CH_2)_m$, onde m é um inteiro de a partir de 1 a 5, entre o carbono carbonila e as unidades de óxido de etileno de repetição. Tal polímero "PEOn" (por exemplo, PEO12 ou PEO24) é monodisperso, isto é, é um polímero distinto único de um peso molecular particular. Similarmente, um peptídeo de CNP conjugado através de um grupo amino a um polímero de "PEGnK" associado com o número nK em geral tem a fórmula: $CH_3$–[–O–$CH_2CH_2$–]$_p$–C(=O)–NHR, onde p é um inteiro maior do que 1. O polímero de "PEGnK" pode também ter opcionalmente um grupo alquileno, $(CH_2)_m$, onde m é um inteiro de a partir de 1 a 5, entre o carbono carbonila e as unidades de óxido de etileno de repetição. No entanto, tal polímero "PEGnK" (por exemplo, PEG1K, PEG2K,PEG5K e PEG20K) é polidisperso, isto é, contém uma mistura de polímeros tendo uma distribuição de pesos moleculares, onde o número nK denota o peso molecular

médio numérico do polímero ($M_n$) em kilo Daltons. Por exemplo, "PEG2K" conjugado a um peptídeo CNP denota um polímero de PEG polidisperso tendo um peso molecular médio numérico de polímero em torno de 2 kDa.

[0367] Quando uma faixa da massa de um polímero (por exemplo, PEG) é dada (por exemplo, em unidades de kDa), a faixa refere-se a uma faixa de pesos moleculares médios numéricos de polímero, não a uma faixa de pesos moleculares de polímeros múltiplos em uma mistura polidispersa, a menos que expressamente de outro modo indicado.

[0368] O termo "halogênio", "haleto" ou "halo" refere-se a flúor, cloro, bromo e/ou iodo.

[0369] O termo "alquila" refere-se a um radical hidrocarbono monovalente saturado linear ou ramificado, onde a alquila pode ser opcionalmente substituída com um ou mais substituintes Q conforme aqui descrito. Em certas modalidades, a alquila é um radical hidrocarbono monovalente saturado linear que tem 1 a 20 ($C_{1-20}$), 1 a 15 ($C_{1-15}$), 1 a 12 ($C_{1-12}$), 1 a 10 ($C_{1-10}$) ou 1 a 6 ($C_{1-6}$) átomos de carbono ou um radical hidrocarbono 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 ($C_{3-10}$) ou 3 a 6 ($C_{3-6}$) átomos de carbono. Conforme aqui usado, grupos alquila $C_{1-6}$ lineares ou $C_{3-6}$ ramificados são também referidos como "alquila inferior". Exemplos de grupos alquila incluem, mas não estão limitados a, metila, etila, propila (incluindo todas as formas isoméricas, incluindo n-propila e isopropila), butila (incluindo todas as formas isoméricas, incluindo n-butila, isobutila, *sec*-butila e *terc*-butila), pentila (incluindo todas as formas isoméricas) e hexila (incluindo todas as formas isoméricas). Por exemplo, $C_{1-6}$ alquila refere-se a um radical hidrocarbono monovalente saturado linear de 1 a 6 átomos de carbono ou um radical hidrocarbono monovalente saturado ramificado de 3 a 6 átomos de carbono.

[0370] O termo "alcóxi" refere-se a um grupo –O-alquila. Em certas

modalidades, um grupo alcóxi pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes Q conforme aqui descrito.

[0371] O termo "haloalquila" refere-se a um grupo alquila que é substituído com um ou mais átomos de haleto. Em certas modalidades, um grupo haloalquila é substituído com um, dois, três, quatro, cinco ou seis átomos de haleto. Em certas modalidades, um grupo haloalquila pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes Q adicionais conforme aqui descrito.

[0372] O termo "cicloalquila" refere-se a um radical hidrocarbono monovalente em ponte e/ou não ponte saturado cíclico, que pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes Q conforme aqui descrito. Em certas modalidades, a cicloalquila tem de a partir 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 ($C_{3-10}$) ou de 3 a 7 ($C_{3-7}$) átomos de carbono. Exemplos de grupos cicloalquila incluem, mas não estão limitados a, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, cicloexila, cicloeptila, decalinila e adamantila.

[0373] O termo "heterociclila" ou "heterocíclico" refere-se a um sistema de anel não aromático monocíclico ou um sistema de anel multicíclico que contém pelo menos um anel não aromático, onde um ou mais dos átomos no anel não aromático são heteroátomos independentemente selecionados de O, S ou N, e os átomos no anel não aromático restantes são átomos de carbono. Em certas modalidades, o grupo heterociclila ou heterocíclico tem de a partir de 3 a 20, de a partir de 3 a 15, de a partir de 3 a 10, de a partir de 3 a 8, de a partir de 4 a 7 ou de a partir de 5 a 6 átomos no anel. Em certas modalidades, a heterociclila é um sistema de anel monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico que pode incluir um sistema de anel fundido ou em ponte, e onde os átomos de nitrogênio ou enxofre podem ser opcionalmente oxidados, os átomos de nitrogênio sendo opcionalmente quaternizados, e alguns anéis podem ser parcialmente ou integralmente satura-

dos, ou aromáticos. A heterociclila pode ser ligada à estrutura principal em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulta na criação de um composto estável. Exemplos de grupos heterocíclicos incluem, mas não estão limitados a, acridinila, azepinila, benzimidazolila, benzindolila, benzoisoxazolila, benzisoxazinila, benzodioxanila, benzodioxolila, benzofuranonila, benzofuranila, benzonaftofuranila, benzopiranonila, benzopiranila, benzotetra-hidrofuranila, benzotetra-hidrotienila, benzotiadiazolila, benzotiazolila, benzotiofenila, benzotriazolila, benzotiopiranila, benzoxazinila, benzoxazolila, benzotiazolila, β-carbolinila, carbazolila, cromanila, cromonila, cinolinila, coumarinila, decaidroisoquinolinila, dibenzofuranila, di-hidrobenzisotiazinila, di-hidrobenzisoxazinila, di-hidrofurila, di-hidropiranila, dioxolanila, di-hidropirazinila, di-hidropiridinila, di-hidropirazolila, di-hidropirimidinila, di-hidropirrolila, dioxolanila, 1,4-ditianila, furanonila, furanila, imidazolidinila, imidazolinila, imidazolila, imidazopiridinila, imidazotiazolila, indazolila, indolinila, indolizinila, indolila, isobenzotetra-hidrofuranila, isobenzotetra-hidrotienila, isobenzotienila, isocromanila, isocoumarinila, isoindolinila, isoindolila, isoquinolinila, isotiazolidinila, isotiazolila, isoxazolidinila, isoxazolila, morfolinila, naftiridinila, octaidroindolila, octaidroisoindolila, oxadiazolila, oxazolidinonila, oxazolidinila, oxazolopiridinila, oxazolila, oxiranila, perimidinila, fenantridinila, fenatrolinila, fenarsazinila, fenazinila, fenotiazinila, fenoxazinila, ftalazinila, piperazinila, piperidinila, 4-piperidonila, pteridinila, purinila, pirazinila, pirazolidinila, pirazolila, piridazinila, piridinila, piridopiridinila, pirimidinila, pirrolidinila, pirrolinila, pirrolila, quinazolinila, quinolinila, quinoxalinila, quinuclidinila, tetra-hidrofurila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidroisoquinolinila, tetra-hidropiranila, tetra-hidrotienila, tetrazolila, tiadiazolopirimidinila, tiadiazolila, tiamorfolinila, tiazolidinila, tiazolila, tienila, triazinila, triazolila 1,3,5-tritianila. Em certas modalidades, um grupo heterocíclico pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes Q con-

forme aqui descrito.

[0374] O termo "arila" refere-se a um grupo aromático monocíclico ou um grupo aromático monovalente multicíclico que contém pelo menos um anel hidrocarbono aromático. Em certas modalidades, a arila tem de a partir de 6 a 20 ($C_{6-20}$), de a partir de 6 a 15 ($C_{6-15}$) ou de a partir de 6 a 10 ($C_{6-10}$) átomos no anel. Exemplos de grupos arila incluem, mas não estão limitados a, fenila, naftila, fluorenila, azulenila, antrila, fenantrila, pirenila, bifenila e terfenila. Arila refere-se também a anéis de carbono bicíclicos ou tricíclicos, onde pelo menos um dos anéis é aromático e os outro podem ser saturados, parcialmente insaturados ou aromáticos, por exemplo, di-hidronaftila, indenila, indanila e tetra-hidronaftila (tetralinila). Em certas modalidades, um grupo arila pode ser opcionalmente substituído com um ou mais sustituintes Q conforme aqui descrito.

[0375] O termo "heteroarila" refere-se a um grupo aromático monocíclico ou um grupo aromático multicíclico que contém pelo menos um anel aromático, onde pelo menos um anel aromático contém um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de O, S e N. Cada anel de um grupo heteroarila pode conter um ou dois átomos de O, um ou dois átomos de S e/ou um a quatro átomos de N, contanto que o número total de heteroátomos em cada anel seja quatro ou menos e cada anel contenha pelo menos um átomo de carbono. A heteroarila pode ser ligada à estrutura principal em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte na criação de um composto estável. Em certas modalidades, a heteroarila tem de a partir de 5 a 20, de a partir de 5 a 15 ou de a partir de 5 a 10 átomos no anel. Exemplos de grupos heteroarila monocíclicos incluem, mas não estão limitados a, pirrolila, pirazolila, pirazolinila, imidazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, tiadiazolila, isotiazolila, furanila, tienila, oxadiazolila, piridila, pirazinila, pirimidinila, piridazinila e triazinila. Exemplos de grupos heteroarila

bicíclicos incluem, mas não estão limitados a, indolila, benzotiazolila, benzoxazolila, benzotienila, quinolinila, tetra-hidroisoquinolinila, isoquinolinila, benzimidazolila, benzopiranila, indolizinila, benzofuranila, isobenzofuranila, chromonila, coumarinila, cinolinila, quinoxalinila, indazolila, purinila, pirrolopiridinila, furopiridinila, tienopiridinila, dihidroisoindolila e tetra-hidroquinolinila. Exemplos de grupos heteroarila tricíclicos incluem, mas não estão limitados a, carbazolila, benzindolila, fenantrolinila, acridinila, fenantridinila e xantenila. Em certas modalidades, um grupo heteroarila pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes Q conforme aqui descrito.

[0376] O termo "opcionalmente substituído" pretende significar que um grupo, incluindo alquila, alcóxi, haloalquila, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila, pode ser substituído com um ou mais substituintes Q (em uma modalidade, um, dois, três ou quatro substituintes Q), onde cada Q é independentemente selecionado do grupo consistindo em ciano, halo, oxo, nitro, $C_{1-6}$ alquila, $C_{1-6}$ alcóxi, halo-$C_{1-6}$ alquila, $C_{3-7}$ cicloalquila, heterociclila, $C_{6-14}$ arila, heteroarila, $–C(O)R^e$, $–C(O)OR^e$, $–C(O)NR^fR^g$, $–C(NR^e)NR^fR^g$, $–OR^e$,$–OC(O)R^e$, $–OC(O)OR^e$, $–OC(O)NR^fR^g$, $–OC(=NR^e)NR^fR^g$, $–OS(O)R^e$, $–OS(O)_2R^e$, $–OS(O)NR^fR^g$, $–OS(O)_2NR^fR^g$, $–NR^fR^g$, $–NR^eC(O)R^f$, $–NR^eC(O)OR^f$, $–NR^eC(O)NR^fR^g$, $–NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $–NR^eS(O)R^f$, $–NR^eS(O)_2R^f$, $–NR^eS(O)NR^fR^g$, $–NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $–SR^e$, $–S(O)R^e$, $–S(O)_2R^e$, e $–S(O)_2NR^fR^g$, onde cada $R^e$, $R^f$, $R^g$ e $R^h$ é independentemente hidrogênio, $C_{1-6}$ alquila, $C_{3-7}$ cicloalquila, heterociclila, $C_{6-14}$ arila ou heteroarila; ou $R^f$ e $R^g$, junto com o átomo de N ao qual eles estão ligados, formam heterociclila.

B. Variantes de CNP

[0377] O uso de CNP22 como um agente terapêutico é limitado pela sua meia-vida curta em plasma (*J. Clin. Endocrinol. Metab*., 78: 1428-35 (1994)). Em plasma humano, a concentração de CNP22 é tipicamente menos do que cinco pico molares. CNP22 é degradado e

excretado da circulação por NEP e NPR-C em humanos (*Growth Hormone & IGF Res.,* 16: S6-S14). Em todos os estudos de humanos e animais usando CNP22 sistemicamente administrado, infusão contínua tem sido usada para aumentar a concentração de CNP22 nos indivíduos. Um peptídeo CNP tendo uma meia-vida mais longa e pelo menos um nível similar de funcionalidade seria benéfico para uma estratégia terapêutica baseada em CNP. Variantes de CNP são também reveladas no Pedido de Patente Internacional relacionado Nº PCT/US08/84270, especificamente aqui incorporado a título de referência.

[0378] A presente invenção provê variantes de CNP que têm afinidade reduzida para NEP e/ou NPR-C e suscetibidade reduzida à clivagem por NEP e/ou excreção por NPR-C, mas que têm funcionalidade substancialmente similar ou melhor do que CNP22 do tipo selvagem. Suscetibidade reduzida de variantes de CNP à clivagem por NEP e/ou excreção por NPR-C aumentaria a meia-via no plasma ou soro das variantes, desta maneira aumentando a oportunidade para as variantes se distribuírem para os tecidos e sítios alvos e realizar os efeitos farmacológicos desejados. Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui têm suscetibilidade reduzida à clivagem por NEP e/ou excreção por NPR-C *in vitro* ou *in vivo* em pelo menos cerca de 15, vez, duas vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes comparado com wtCNP22 e têm meia-vida no plasma ou soro aumentada *in vivo* em pelo menos cerca de 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes comparado com wtCNP22, enquanto retendo pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% da funcionalidade de wtCNP22, ou tendo pelo menos cerca de 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes maior funcionalidade do que wtCNP22. A funcionalidade do CNP pode ser avaliada em termos de,

por exemplo, nível de um ou mais biomarcadores (por exemplo, cGMP) associados com formação ou crescimento de cartilagem ou osso em um estudo *in vitro* ou *in vivo*, o comprimento de ossos particulares em um estudo *ex vivo* ou *in vivo*.

[0379] Substratos naturais de NEP são peptídeos pequenos e natriuréticos (cerca de 2,2 a cerca de 3,2 kDa) são os maiores dos substratos naturais. De acordo com análises cristalográficas de raio X, o sítio ativo de NEP é enterrado fundo em uma cavidade central, efetivamente restringindo o tamanho das moléculas de substrato para não mais do que cerca de 3 kDa (Oefner e outros, *J. Mol. Biol.,* 296: 341-349 (2000)). Com base em estudos de sinalização de NPR-B, variantes de CNP22, tais como CNP-17 (retendo apenas o domínio cíclico, Cys6-Cys22, de CNP22) e CNP-53 (CNP22 com uma extensão de 31 aminoácidos no terminal N), podem ainda se ligar e ativar similaridade de NPR-B ao wtCNP-22 de 2,2 kDa. Desta maneira, a invenção compreende variantes de CNP conjugadas a um polímero natural (por exemplo, peptídeo) e/ou sintético (por exemplo, PEG) no terminal N e/ou terminal C de CNP22 ou suas variantes, que exibem resistência aumentada à NEP, mas retêm a habilidade em se ligar a e ativar o receptor de sinalização de NPR-B.

[0380] Em uma modalidade, a invenção compreende variantes de CNP representadas pela fórmula geral:

[0381] (x)-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$Lys_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº:139), ou

[0382] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$Lys_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$Lys_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº:140), onde:

[0383] (x) e (z) são cada um independentemente um polímero natural (por exemplo, uma sequência de peptídeo contendo pelo menos um aminoácido) e/ou um polímero sintético (por exemplo, PEG) con-

forme descrito aqui, de maneira que a massa total da variante de CNP é caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, na faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa. Em uma modalidade, o resíduo de Cys6 a Cys22 de uma porção cíclica. Em uma modalidade, (x) e/ou (z) compreendem uma extensão de aminoácido derivada de NPPC ou um polipeptídeo não CNP (por exemplo, ANP, BNP, IgG, etc), onde a extensão contém 1 a 40, 1 a 35, 1 a 31, 5 a 35, 5 a 31 ou 5 a 15 aminoácidos. Em outra modalidade, as variantes de CNP compreendem uma ou mais modificações e/ou substituições com outro aminoácido natural, um aminoácido não natural, um peptidomimético e/ou um isóstere ligado a peptídeo em uma ou mais das posições que seguem de CNP22: Gly1, Lys4, Gly5, Cys6, Phe7, Gly8, Leu9, Lys10, Leu11, Ile14, Gly15, Ser16, Met17, Gly19, Leu20 e Gly21,

[0384] Em outra modalidade, variantes de CNP tendo uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, projetadas para resistência aumentada à degradação por NEP, são representadas pela fórmula geral:

[0385] (x)-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$(h)_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 141), ou

[0386] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-$(b)_4$-$Gly_5$-$Cys_6$-$Phe_7$-$Gly_8$-$Leu_9$-$(h)_{10}$-$Leu_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-$Ile_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-$Met_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-$Leu_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 6), onde:

[0387] (x) é um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é PEG (ou PEO) e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido contendo de a partir de 1 a 35 aminoácidos e derivada de NPPC ou suas variantes com substituições e/ou deleções, ANP, BNP ou outros (po-

li)peptídeos não CNP tais como, por exemplo, albumina do soro, IgG, glicoproteínas ricas em histidina, fibronectina, fibrinogênio, polipeptídeos contendo dedo de zinco, osteocrina ou fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2);

[0388] (z) pode estar ausente ou pode ser um grupo polimérico sintético ou natural, ou uma combinação dos mesmos, onde um exemplo não limitante de um grupo polimérico sintético é PEG, e um exemplo não limitante de um grupo polimérico natural é uma sequência de aminoácido derivada de um polipeptídeo natriurético (por exemplo, NPPC, CNP, ANP ou BNP) ou polipeptídeo não natriurético (por exemplo, albumina do soro ou IgG); e

[0389] (b) e (h) independentemente podem ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou podem ser substituídos com uma substituição de aminoácido conservativa ou qualquer aminoácido natural ou não natural ou peptidomimético que não tenha uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Glu ou Ser. Em uma modalidade, (b) é Arg. Em outra modalidade, para resistência à NEP aperfeiçoada, (b) não é Gly. Em ainda outra modalidade, (h) não é Arg.

[0390] Exemplos não limitantes de sequências de aminoácido derivadas de NPPC ou suas variantes incluem:

[0391] Arg,

[0392] Glu-Arg,

[0393] Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID Nº: 7),

[0394] Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID Nº: 8),

[0395] Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (SEQ ID Nº: 9),

[0396] Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (SEQ ID Nº: 10),

[0397] Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (SEQ ID Nº: 11),

[0398] Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (SEQ ID Nº: 12),

[0399] Gly-Ala-Asn-Arg-Met (SEQ ID Nº: 13),

[0400] Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (SEQ ID Nº: 14),

[0401] Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (SEQ ID Nº: 15),

[0402] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala (SEQ ID Nº: 16),

[0403] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg (SEQ ID Nº: 17),

[0404] Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (SEQ ID Nº: 18),

[0405] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (SEQ ID Nº:19),

[0406] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (SEQ ID Nº:20),

[0407] 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), e

[0408] 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).

[0409] Exemplos não limitantes de sequências de aminoácido derivadas de polipeptídeos não CNP tais como, por exemplo, ANP, BNP, albumina do soro e IgG incluem:

[0410] Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (SEQ ID Nº: 23);

[0411] Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (SEQ ID Nº: 24);

[0412] Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID Nº: 25);

[0413] Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (SEQ ID Nº: 26);

[0414] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (SEQ ID Nº: 27);

[0415] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (SEQ ID Nº: 28);

[0416] Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (SEQ ID Nº: 29);

[0417] Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (SEQ ID Nº: 30);

[0418] Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (SEQ ID Nº: 31);

[0419] Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (SEQ ID Nº: 32).

[0420] Em uma modalidade, o grupo (x) N-terminal e/ou o grupo (z) C-terminal de qualquer uma das variantes de CNP tendo um grupo (x) e/ou (z), conforme aqui descrito, compreendem independentemente uma sequência de aminoácido que contém um número pequeno de, se algum, aminoácidos naturais ou não naturais ácidos (por exemplo, Asp ou Glu). Em outra modalidade, (x) e/ou (z) são enriquecidos em aminoácidos naturais ou não naturais (por exemplo, Lys, Arg ou His) para manter um pI alcalino similar ao pI de CNP22 (pI 8,9). Em uma modalidade, o pI das variantes de CNP está na faixa de a partir de cerca de 8 a cerca de 10,5, projetadas de maneira que as variantes de CNP possam difundir mais prontamente através da matriz extracelular que circunda os condrócitos de placas de crescimento de osso. Em modalidades mais estreitas, o pI das variantes de CNP é de a partir de cerca de 8,5 a cerca de 10,5 ou de a partir de cerca de 8,5 a cerca de 10 ou de a partir de cerca de 9 a cerca de 10.

[0421] Em ainda outra modalidade, (x) e/ou (z) são enriquecidos em aminoácidos naturais ou não naturais polares, projetados para solubilidade aquosa aumentada. Em ainda outra modalidade, (x) e/ou (z) contêm um número pequeno, se algum, de aminoácidos naturais ou não naturais hidrofóbicos (por exemplo, Ala, Val, Leu, Ile ou Met).

[0422] Em uma modalidade adicional, o terminal N das variantes de CNP termina em pelo menos um resíduo glicina, projetado para meia-vida no soro aumentada. Em uma modalidade relacionada, para prevenir formação de piroglutamato, o terminal N de variantes de CNP termina em um resíduo glicina se ele de outra maneira terminar em glutamina. Em uma modalidade, o grupo (x) contém uma extensão de

aminoácido cujo terminal N termina em pelo menos um resíduo glicina. Em outra modalidade, (x) e/ou (z) não contêm dois aminoácidos básicos naturais ou não naturais adjacentes (por exemplo, Lys-Lys ou Arg-Arg) projetados para reduzir a susceptibidade à clivagem pela protease furina. Em uma modalidade, (x) não contém dois aminoácidos básicos adjacentes imediatamente precedendo a posição correspondendo a Gly1 de CNP22.

[0423] Em ainda outra modalidade, o grupo (x) e/ou o grupo (z) das variantes de CNP compreendem uma sequência de aminoácido derivada de NPPC (por exemplo, derivada de CNP53). Em uma modalidade, (x) compreende uma sequência de aminoácido derivada da cauda N-terminal de ANP ou BNP. Em outra modalidade, (z) compreende uma sequência de aminoácido derivada da cauda C-terminal de ANP ou BNP. Em uma modalidade adicional, (x) e/ou (z) compreendem uma sequência de aminoácido derivada de um polipeptídeo natriurético tal como, por exemplo, IgG, albumina do soro humano (HSA), glicoproteínas ricas em histidina, fibronectina, fibrinogênio, polipeptídeos contendo dedo de zinco, FGF-2 e proteínas de direcionamento a osso (por exemplo, osteocrina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína).

[0424] Em qualquer modalidade descrita aqui onde CNP22 ou uma variante do mesmo pode ter um grupo (x) N-terminal e/ou um grupo (z) C-terminal, (x) e/ou (z) pode conter independentemente uma sequência de aminoácido derivada do domínio funcional de uma proteína morfogenética do osso. Uma extensão de aminoácido N-terminal e/ou C-terminal derivada do domínio funcional de um BMP pode aumentar a resistência à NEP, e então a meia-vida no soro da variante de CNP, aumentando a massa total da variante de CNP para as caracterizadas pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, uma faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa. Ainda,

uma vez que certos BMPs são fatores de crescimento e citocinas que induzem a formação de osso e cartilagem, um fragmento derivado do domínio funcional de um BMP pode promover crescimento de condrócito, cartilagem ou osso por um mecanismo distinto de ativação da função de guanilil ciclase de NPR-B pelo domínio cíclico de CNP22 ou uma variante do mesmo. Exemplos não limitantes de MBPs que promovem formação e desenvolvimento de osso, formação e desenvolvimento de cartilagem e/ou diferenciação de osteoblasto incluem BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 e BMP8a. Em uma modalidade, o terminal N e/ou o terminal C de CNP22 ou uma variante do mesmo são independentemente conjugados a uma sequência de aminoácido derivada dos últimos 140 aminoácidos na porção C-terminal de BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 ou BMP8a.

[0425] Em uma modalidade, as variantes de CNP contêm uma extensão de aminoácido no terminal N e/ou terminal C de CNP22 oo CNP17 incluindo, mas não limitado a:

[0426] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-53**) (SEQ ID Nº: 4);

[0427] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-37**, **Análogo BL**) (SEQ ID Nº: 60);

[0428] AAWARLLQEHPNAGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CA**) (SEQ ID Nº: 61);

[0429] AAWARLLQEHPNARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CB**) (SEQ ID Nº: 62);

[0430] DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CC**) (SEQ ID Nº: 63);

[0431] RGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 40);

[0432] ERGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 38);

[0433] GANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 64);

[0434] GANRRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 65);

[0435] GANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 66);

[0436] GANSSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 67);

[0437] GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 144); e

[0438] SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (Análogo CD) (CNP17 tendo caudas N-terminais e C-terminais derivadas de BNP) (SEQ ID Nº: 68).

[0439] Em outra modalidade, as variantes de CNP têm uma substituição de K4R na posição 4 de CNP22. Exemplos não limitantes de variantes de CNP(K4R) incluem:

[0440] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo AY**) (SEQ ID Nº: 36);

[0441] GANPRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CI**) (SEQ ID Nº: 37);

[0442] RGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo AZ**) (SEQ ID Nº: 41);

[0443] ERGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo BA**) (SEQ ID Nº: 39);

[0444] GANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CH**) (SEQ ID Nº: 69); e

[0445] GANSSGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CG**) (SEQ ID Nº: 70).

[0446] Em modalidades adicionais, as variantes de CNP são quimeras compreendendo CNP22, ou uma variante do mesmo, tendo adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição (ões) de aminoácido, e um fragmento de peptídeo derivado de um polipeptídeo ou proteína que não CNP, ou o polipeptídeo não CNP ou proteína inteiro, no terminal N do peptídeo CNP, onde CNP22 ou a sua variante pode ter opcionalmente uma extensão de aminoácido N-terminal de um ou mais resíduos de aminoácido. Em certas modalidades, as quimeras de CNP

compreendem CNP22 ou uma variante do mesmo que tem uma extensão de aminoácido N-terminal de um ou mais resíduos de aminoácido. Em certas modalidades, as quimeras de CNP contêm resíduos de lisina-lisina (KK) ou resíduos GANKK imediatamente precedendo a primeira posição de CNP22 (Gly no caso de CNP22) ou uma variante do mesmo. Em outras modalidades, as quimeras de CNP contêm um ou dois resíduos diferentes da lisina-lisina imediatamente precedendo a primeira posição de CNP22 ou uma variante do mesmo. Exemplos não limitantes de resíduos que podem imediatamente preceder a primeira posição de CNP22 ou uma variante do mesmo incluem 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) e GANSS (SEQ ID Nº: 11).

[0447] Em outra modalidade, as variantes de CNP são quimeras compreendendo CNP22 e um fragmento de peptídeo N-terminal incluindo, mas não limitado a:

[0448] GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CQ**) (quimera de fragmento de proteína rica em histidina (HRGP)-CNP22)

[0449] (SEQ ID Nº: 76);

[0450] GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CR**) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID Nº: 77);

[0451] GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CX**) (quimera de fragmento de HRGP-CNP22) (SEQ ID Nº: 78);

[0452] GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CF**) (quimera de fragmento de $IgG_1(F_c)$-CNP22) (SEQ ID Nº: 79);

[0453] GQHKDDNPNLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (**CY Análogo**) (quimera de fragmento de albumina de soro humano (HSA)-CNP22 chimera) (SEQ ID Nº: 80);

[0454] GERAFKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo CE**) (quimera de fragmento de HSA-CNP22) (SEQ ID Nº: 81);

[0455] FGIPMDRIGRNPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CZ) (quimera de fragmento de "inibidor de NPR C" osteocrina-CNP22) (SEQ ID Nº: 82); e

[0456] GKRTGQYKLGSKTGPGPKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (DA Análogo) (quimera de fragmento de "domínio de ligação à heparina" FGF2-CNP22) (SEQ ID Nº: 83).

[0457] Em ainda outra modalidade, as variantes de CNP são quimeras compreendendo um fragmento de peptídeo N-terminal e CNP22 onde arginina substitui Lys4 de CNP22 ("CNP22(K4R)"), incluindo, mas não limitado a:

[0458] GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CK Análogo) (quimera de fragmento de IgG1(Fc)-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 84);

[0459] GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CL) (quimera de fragmento de HSA-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 85);

[0460] GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CM) (quimera de fragmento de fibronectina--CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 86);

[0461] GQTHSSGTQSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CN) (quimera de fragmento de fibrinogênio-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 87);

[0462] GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CO) (quimera de fragmento de fibrinogênio-CNP22(K4R)

(SEQ ID Nº: 88); e

[0463] GSSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Análogo CP) (quimera de fragmento dedo de zinco-CNP22(K4R)) (SEQ ID Nº: 89).

[0464] Quimeras compreendendo IgG e CNP22 ou uma variante do mesmo são projetadas para, inter alia, resistência aumentada à degradação por NEP e ligação reduzida à albumina do soro, quimeras de CNP compreendendo um fragmento de superfície de HSA são projetadas para, *inter alia*, imunogenicidade reduzida e ligação reduzida à albumina do soro. Quimeras de HRGP-CNP22 e HRGP-CNP22(K4R) contendo uma sequência catiônica, rica em histidina, não lisina, não arginina, no terminal N são projetadas para, *inter alia*, estabilidade aumentada a proteases. Quimeras contendo um fragmento de osteocrina são projetadas para liberação, quando da clivagem por protease (por exemplo, furina), do fragmento de osteocrina nas placas de crescimento ósseo, onde o fragmento inibiria o receptor de excreção NPR-C. Com relação a quimeras compreendendo um fragmento de ligação à heparina FGF2, a ligação de heparina ao fragmento é projetada para proteger a quimera de degradação, desta maneira provendo uma meia-vida no soro mais longa. Quimeras contendo um fragmento de fibronectina, fibrinogênio ou dedo de zinco são projetadas para ligação reduzida à albumina do soro, dentre outras características.

[0465] Não pretendendo ser limitado pela teoria, uma variante de CNP de peso molecular de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa que tem resistência aumentada à degradação por NEP e tem funcionalidade similar ou aperfeiçoada (por exemplo, ligação a NPR-B e estimulação de sinalização de cGMP) comparado com wtCNP22 pode ser mais eficaz se ela não se ligar firmemente a proteínas do plasma tal como albumina do soro. Uma variante de CNP que não se liga firmemente a proteínas do plasma (por exemplo, albumina

do soro) pode ser mais eficaz em difusão através da cartilagem, atingindo condrócitos de placas de crescimento de osso e se ligando a e ativando NPR-B para sinalização de cGMP. Em uma modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma (por exemplo, albumina do soro) são quimeras compreendendo CNP22 ou uma variante do mesmo e um fragmento de peptídeo de IgG. Em outra modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma são quimeras compreendendo CNP22 ou CNP22(K4R) e um fragmento de um polipeptídeo (por exemplo, IgG, HSA, fibronectina, fibrinogênio, um polipeptídeo contendo dedo de zicno, etc). Em outra modalidade, variantes de CNP projetadas para ligação reduzida a proteínas do plasma compreendem CNP22 ou uma variante do mesmo conjugado a um polímero hidrofílico ou solúvel em água. Em uma modalidade, o polímero hidrofílico ou solúvel em água é PEG (ou PEO). Em outra modalidade, o polímero hidrofílico ou solúvel em água (por exemplo, PEG) é funcionalizado com um ou mais grupos funcionais que fornecem uma carga negativa ao polímero sob condições fisiológicas, tais como, por exemplo, grupos carboxila, sulfato ou fosfato, ou uma combinação dos mesmos.

[0466] Em uma modalidade adicional, variantes de CNP da invenção incluem peptídeos CNP truncados variando de CNP-17 (hCNP-17) a CNP53 (hCNP-53) humano e tendo sequências de aminoácido do tipo selvagem derivadas de hCNP-53. Tais peptídeos CNP truncados incluem:

[0467] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-53) (SEQ ID Nº: 4);

[0468] LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-52) (SEQ ID Nº: 146);

[0469] RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-51) (SEQ ID Nº: 147);

[0470] VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGL-KLDRIGSMSGLGC (CNP-50) (SEQ ID Nº: 148);

[0471] DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKL-DRIGSMSGLGC (CNP-49) (SEQ ID Nº: 149);

[0472] TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKL-DRIGSMSGLGC (CNP-48) (SEQ ID Nº: 150);

[0473] KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKL-DRIGSMSGLGC (CNP-47) (SEQ ID Nº: 151);

[0474] SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-46) (SEQ ID Nº: 152);

[0475] RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-45) (SEQ ID Nº: 153);

[0476] AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-44) (SEQ ID Nº: 154);

[0477] AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-43) (SEQ ID Nº: 155);

[0478] WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-42) (SEQ ID Nº: 156);

[0479] ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID Nº: 157);

[0480] RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (CNP-40) (SEQ ID Nº: 158);

[0481] LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID Nº: 159);

[0482] LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID Nº: 160);

[0483] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (SEQ ID Nº: 60);

[0484] EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-36) (SEQ ID Nº: 161);

[0485] HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-35) (SEQ ID Nº: 162);

[0486] PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34) (SEQ ID Nº: 163);

[0487] NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-33) (SEQ ID Nº: 164);

[0488] ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-32) (SEQ ID Nº: 165);

[0489] RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-31) (SEQ ID Nº: 166);

[0490] KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-30) (SEQ ID Nº: 167);

[0491] YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-29) (SEQ ID Nº: 168);

[0492] KGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-28) (SEQ ID Nº: 169);

[0493] GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-27) (SEQ ID Nº: 170);

[0494] ANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-26) (SEQ ID Nº: 171);

[0495] NKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-25) (SEQ ID Nº: 172);

[0496] KKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-24) (SEQ ID Nº: 173);

[0497] KGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-23) (SEQ ID Nº: 174);

[0498] GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-22) (SEQ ID Nº: 1);

[0499] LSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-21) (SEQ ID Nº: 175);

[0500] SKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-20) (SEQ ID Nº: 176);

[0501] KGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-19) (SEQ ID Nº: 177);

[0502] GCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-18) (SEQ ID Nº: 178); e

[0503] CFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-17) (SEQ ID Nº: 2).

[0504] Em certas modalidades, variantes de CNP não incluem CNP-17, CNP-22 ou NCP-53.

[0505] Em outra modalidade, os peptídeos CNP truncados variando de hCNP-17 a hCNP-53 podem conter adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(oes) de aminoácido com aminoácido(s) ou peptidomimético(s) naturais ou não naturais (por exemplo, isóstere(s) de ligação a peptídeo), conforme descrito aqui, em uma ou mais das posições de aminoácido dos peptídeos CNP truncados particulares. Em ainda outra modalidade, os peptídeos CNP truncados tendo sequências do tipo selvagem ou adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) de aminoácido podem ser conjugados no terminal N, terminal C e/ou sítio(s) interno(s) a qualquer uma das porções descritas aqui, incluindo, mas não limitado a, porções de direcionamento a osso ou cartilagem (por exemplo, bifosfonatos, sequências de peptídeo de direcionamento a osso ou cartilagem (por exemplo, polyAsp, polyGlu), sequências de peptídeo derivadas de domínios de direcionamento a osso de prtoeinas do osso (por exemplo, osteopontina, osteocalcina, sialoproteían)), sequências de peptídeo derivadas dos domínios funcionais de proteínas morfogenéticas do osso (por exemplo, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7, BMP8a), sequências de peptídeo derivadas de polipeptídeo natriuréticos (por exemplo, NPPC, ANP, BNP), sequências de peptídeo derivadas de polipeptídeos de origem não natriurética (por exemplo, albumina do soro, IgG, glicoproteínas ricas em histidina, fibronectina, fibrinogênio, polipeptídeos contendo dedo de zinco, FGF-2, osteocrina), porções que reduzem a excreção renal (por exemplo, porções de PEG negativamente carregadas), polímeros hidrofílicos (por exemplo, PEG), carboidratos (por exemplo, carboidratos reconhe-

cidos por receptores na superfície de células nas placas de crescimento de osso), ácido hidrofóbicos (por exemplo, ácidos C5-C12 carboxílicos, ácidos graxos naturais), fosfolipídeos e combinações dos mesmos. Em uma modalidade, os peptídeos CNP truncados tendo sequências do tipo selvagem ou adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) de aminoácido, e opcionalmente conjugados a uma ou mais porções no terminal N, terminal C e/ou sítio(s) interno(s), têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa.

[0506] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP são derivadas de CNP37, que é QEHPNARKYKGANKK-CNP22 (SEQ ID Nº: 60). As variantes de CNP37 podem conter adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) de aminoácido com aminoácidos(s) ou peptidomimético(s) naturais ou não naturais (por exemplo, isóstere(s) de ligação a peptídeo) em qualquer uma ou mais das 37 posições de CNP37. Exemplos não limitantes de substituições que podem ser feitas em NCP37, com base na numeração de CNP22, incluem K4R, G5S, G5R, G8S, K10R, G15S, S16Q, M17N, G19R e suas combinações. Em uma modalidade, o derivado de CNP37 contém uma substituição de Met17 para um aminoácido ou peptidomimético natural (por exemplo, asparagina) ou não natural, projetado em parte para evitar oxidação do átomo de enxofre de metionina. Em outra modalidade, as variantes de CNP37 contêm substituição(ões) de Lys8, Lys10, Lys14 e/ou Lys15 (com base na numeração do terminal N de CNP37) para aminoácido(s) ou peptidomimético(s) naturais ou não naturais básicos, projetados em parte para reduzir ligação à albumina.

[0507] Em adição a ou alternativamente a adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) de aminoácido, os derivados de CNP37 podem ser conjugados no terminal N, terminal C e/ou sítio in-

terno a qualquer uma das porções descritas aqui, incluindo, mas não limitado a, porções de direcionamento a osso ou cartilagem (por exemplo, domínios de peptídeo se direcionando a osso), porções que reduzem a excreção renal (por exemplo, porções PEG negativamente carregadas), polímeros hidrofílicos (por exemplo, PEG), sequências de aminoácido compreendendo um ou mais aminoácidos (por exemplo, fragmento de "inibidor de NPR-C" osteocrina), carboidratos (por exemplo, carboidratos reconhecidos pelos receptores na superfície de células em placas de crescimento de osso), ácidos hidrofóbicos (por exemplo, ácidos $C_5$-$C_{12}$ carboxílicos e ácidos graxos naturais) e suas combinações.

[0508] Em uma modalidade, as variantes de CNP são peptídeos CNP37 modificados tendo mutação(ões)/substituição(ões) no sítio de clivagem de furina (sublinhado), projetados para melhorar a resistência *in vivo* à protease furina, e/ou contendo glicina (sublinhada) no terminal N, projetados para melhorar a estabilidade no plasma e prevenir formação de piroglutamato. Tais variantes de CNP37 incluem, mas não estão limitadas a:

[0509] GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CS**) (SEQ ID Nº: 71);

[0510] GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CT**) (SEQ ID Nº: 72);

[0511] GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CU**) (SEQ ID Nº: 73);

[0512] GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CW**) (SEQ ID Nº: 74);

[0513] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37, **An. DB**) (SEQ ID Nº: 75); e

[0514] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID Nº: 145).

[0515] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP da invenção incluem peptídeos CNP e variantes do mesmo que podem ser produzidos através do processo de proteína de fusão descrito aqui. Exemplos não limitantes de variantes de CNP que podem ser produzidas através do processo de proteína de fusão descrito aqui, usando clivagem química ou proteolítica ou autoclivagem de proteína, incluem:

[0516] GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKG-CFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-wtCNP53) (SEQ ID Nº: 179);

[0517] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-wtCNP37) (SEQ ID Nº: 75);

[0518] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (wtCNP37) (SEQ ID Nº: 60);

[0519] GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA fragment-wtCNP27) (SEQ ID Nº: 144);

[0520] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (SEQ ID Nº: 36);

[0521] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKG-CFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP53(M48N)] (SEQ ID Nº: 180);

[0522] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (SEQ ID Nº: 181);

[0523] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (SEQ ID Nº: 182);

[0524] GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (SEQ ID Nº: 183);

[0525] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (SEQ ID Nº: 184);

[0526] PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKG-CFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-wtCNP53) (SEQ ID Nº: 185);

[0527] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Pro-Gly-wtCNP37) (SEQ ID Nº: 145);

[0528] PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-wtCNP37) (SEQ ID Nº: 186);

[0529] PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (wtCNP34) (SEQ ID Nº: 187);

[0530] P-GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-HSA-wtCNP27) (SEQ ID Nº: 188);

[0531] PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27 (K4,5,9R)] (SEQ ID Nº: 189);

[0532] MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKG-CFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-wtCNP53) (SEQ ID Nº: 190);

[0533] MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Met-Gly-wtCNP37) (SEQ ID Nº: 191);

[0534] MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-wtCNP37) (SEQ ID Nº: 192);

[0535] M-GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-wtCNP27) (SEQ ID Nº: 193);

[0536] MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27 (K4,5,9R)] (SEQ ID Nº: 194).

[0537] Outras variantes de CNP, incluindo peptídeos CNP truncados variando de hCNP-17 a hCNP-53e tendo sequências do tipo selvagem ou adição(ões), deleção(ões) e/ou substituição(ões) de aminoácido, podem ser também produzidas através do processo de proteína de fusão descrito aqui, contanto que o sítio pretendido de clivagem química ou proteolítica da proteína de fusão não esteja presente dentro da sequência de aminoácido da própria variante de CNP alvo. Como um exemplo não limitante, o processo de proteína de fusão descrito aqui pode ser empregado para produzir wtCNP34 truncado usando clivagem de ácido fórmico.

[0538] Em modalidades adicionais, para qualquer um dos peptídeos CNP e variantes de CNP descritos aqui que têm resíduo(s) asparagina (Asn/N) e/ou resíduo(s) glutamina (Gln/Q), tenham ou não uma sequência do tipo selvagem ou uma sequência de aminoácido não natural, qualquer resíduo(s) Asn e/ou resíduo Gln pode ser substituído com quaisquer outros aminoácidos naturais ou não naturais, incluindo substituições conservativas tais como Asn a Glu. Tal(is) substituição(ões) é/são em parte projetada(s) para minimizar ou evitar qualquer desaminação potencial de asparagina e/ou glutamina. Exemplos não limitantes de peptídeos CNP e variantes onde qualquer resíduo Asn e/ou qualquer resíduo(s) Gln pode ser independentemente substituído com quaisquer outros aminoácidos naturais ou não naturais, incluindo substituições conservativas tais como Asn a Gln, incluem 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), e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36). Em certas modalidades, um resíduo asparagina dos peptídeos CNP e variantes de CNP descritos aqui não é substituído com glutamina, ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em certas modalidades, um resíduo glutamina nos peptídeos CNP e variantes de CNP descritos aqui não é substituído com asparagina, ácido aspártico ou ácido glutâmico. Como um exemplo não limitante, resíduos asparagina 7 e/ou 15 de Pro-Gly-wtCNP37 (PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº: 145) podem ser independentemente substituídos com quaisquer outros aminoácidos naturais ou não naturais, incluindo glutamina, para evitar qualquer desaminação potencial do(s) resíduo(s) asparagina em ácido aspártico ou ácido isoaspártico. Em certas modalidades, os resíduos asparagina 7 1/ou 15 de Pro-Gly-wtCNP37 não são substituídos com glutamina, ácido aspártico ou ácido glutâmico.

[0539] É compreendido, no entanto, que a presente invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, até todos, os resíduos suscetíveis à desaminação ou reação tipo desaminação (por exemplo, isomerização) podem ser convertidos em outro(s) resíduo(s) através de desaminação ou uma reação tipo desaminação até qualquer ponto, até 100% de conversão por resíduo convertido. Em certas modalidades, a invenção compreende variantes de CNP onde:

(1) qualquer um ou mais, até todos, os resíduos asparagina (Asn/N) podem ser convertidos em ácido aspártico ou aspartato, e/ou ácido isoaspartático ou isoaspartato, através de desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido; ou

(2) qualquer um ou mais, até todos, os resíduos glutamina (Gln/Q) podem ser convertidos em ácido glutâmico e/ou ácido isoglutâmico ou isoglutamato, através de desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido; ou

(3) qualquer um ou mais de, até todos, os resíduos de ácido aspártico ou aspartato (Asp/D) podem ser convertidos em ácido isoaspártico ou isoaspartato através de uma reação tipo desaminação (também chamada isomerização) até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido; ou

(4) qualquer um ou mais, até todos, os resíduos de ácido glutâmico ou glutamato (Glu/E) podem ser convertidos em ácido isoglutâmico ou isoglutamato através de uma reação tipo desaminação (também chamada isomerização) até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido; ou

(5) uma combinação dos acima.

[0540] Como um exemplo não limitante, a invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, até todos, os resíduos asparagina, glutamina, ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC] (SEQ ID Nº: 145) podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido glutâmico/glutamato e/ou ácido isoglutâmico/isoglutamato, (3) ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (4) ácido isoglutâmico/isoglutamato, respectivamente, através de desaminação ou reação tipo desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido, conforme acima descrito.

[0541] Como um exemplo adicional, a invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais de, até todos, os resíduos de asparagina e/ou ácido aspártico de Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC] (SEQ ID Nº: 145) podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (2) ácido isoaspártico/isoaspartato, respectivamente, através de desaminação ou uma reação tipo desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido.

[0542] Como outro exemplo, a presente invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, até todos, os resíduos de asparagina, glutamina, ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de Gly-wtCNP37 [GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 75)] podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspartático/isoaspartato, (2) ácido glutâmico/glutamato e/ou ácido isoglutâmico/isoglutamato; (3) ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (4) ácido isoglutâmico/isoglutamato, respectivamente, através de desaminação ou uma reação tipo desaminação até

cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido.

[0543] Como outro exemplo ainda, a invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, até todos, os resíduos de asparagina, glutamina, ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de wtCNP37 [QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 60)] podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspartático/isoaspartato, (2) ácido glutâmico/glutamato e/ou ácido isoglutâmico/isoglutamato; (3) ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (4) ácido isoglutâmico/isoglutamato, respectivamente, através de desaminação ou uma reação tipo desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido.

[0544] Como um exemplo adicional, a presente invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais de, ou todos, os resíduos de asparagina, ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de uma quimera de HSA-wtCNP27, GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 144), podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspártico/aspartato, (2) ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (3) ácido isoglutâmico/isoglutamato, respectivamente, através de desaminação ou reação tipo desaminação até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido.

[0545] Como um exemplo adicional, a invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, até todos, os resíduos de asparagina, ácido aspártico e/ou ácido glutâmico de uma quimera de Pro-HSA-wtCNP27, PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 188), podem ser convertidos em (1) ácido aspártico/aspartato e/ou ácido isoaspártico/isoaspartato, (2) ácido isoaspártico/isoaspartato e/ou (3) ácido isoglutâmico/isoglutamato, res-

pectivamente, através de desaminação ou reação tipo desaminação de até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de conversão por resíduo convertido.

[0546] Ainda, a presente invenção compreende variantes de CNP onde qualquer um ou mais, ou todos, os resíduos metionina (Met/M) podem ser oxidados para qualquer forma oxidada quimicamente possível (por exemplo, sulfóxido e/ou sulfona) até cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% de transformação por resíduo oxidado.

[0547] Em outra modalidade, as variantes de CNP compreendem CNP22 ou suas variantes conjugados no terminal N e/ou terminal C a porção(ões) que facilitam o transporte das variantes através de uma membrana celular ou barreira celular. Em uma modalidade, as variantes de CNP são conjugadas no terminal N e/ou terminal C a sequência(s) de peptídeo que facilitam transporte das variantes através de uma membrana celular ou barreira celular, incluindo através de transportadores de peptídeo ativos.

[0548] Em uma modalidade adicional, o terminal N e/ou o terminal C de CNP22 ou uma variante do mesmo são conjugados a porções químicas tais como, por exemplo, polímeros naturais e/ou sintéticos, para aumentar a massa total do peptídeo CNP modificado para as faixas descritas em geral aqui, por exemplo, uma faixa de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 KDa a cerca de 6 ou 7 kDa. Em uma modalidade, as porções químicas são polímeros biocompatíveis hidrofílicos ou solúveis em água naturais (por exemplo, peptídeos, carboidratos) ou sintéticos (por exemplo, PET (ou PEO)).

[0549] Em uma modalidade particular, o terminal N e o terminal C de CNP22 ou uma variante do mesmo são conjugados a polímeros PEG (ou PEO) para resultar em uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de

2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa. Peguilação de CNP22 ou uma variante do mesmo é projetada, *inter alia*, para reduzir a imunogenicidade e melhorar a meia-vida através da redução da excreção renal e aumento da resistência à protease. Uma porção de PEG pode ser ligada ao terminal N e/ou C de CNP22 ou qualquer variante descrita aqui incluindo, mas não limitado a, CNP17 (a porção ciclizada Cys6-Cys22 de CNP22), CNP37 e variantes de CNP17, CNP22 ou CNP37 tendo extensão(ões) de aminoácido N e/ou C terminais, substituição(ões) de amino ácido e/ou deleção(ões) de aminoácido. Em uma modalidade, os resíduos Lys4 e/ou Lys10 de CNP17, CNP22 ou CNP37, ou suas variantes, são substituídos com um aminoácido natural ou não natural (por exemplo, Arg, Gly, Ser, Gln, Glu ou Cit) ou peptidomimético que não contém uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, para precludir qualquer PEGuilação potencial desses resíduos lisina. Em uma modalidade, os resíduos Lys4 e/ou Lys10 dos peptídeos CNP são substituídos com Arg. Em outra modalidade, o resíduo Lys10 não é substituído com Arg.

[0550] Em uma modalidade adicional, variantes de CNP (incluindo CNP22 e suas variantes) tendo uma porção de PEG (ou PEO) e uma extensão de aminoácido no terminal N contêm arginina na posição imediatamente precedendo a posição correspondendo a Gly1 de CNP22. Tais variantes de CNP PEGuiladas são projetadas para resistência aumentada à degradação por NEP, ligação reduzida à albumina do soro e atividade funcional de CNP aumentada (por exemplo, ativação de sinalização de cGMP). Exemplos não limitantes de variantes de CNP PEGuiladas incluem 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), e PEO12-R-CNP22(SEQ ID Nº: 41), onde PEO24 é um polímero de PEG de 1,2 kDa monodisperso e PEO12 é um polímero de PEG de 0,6 kDa monodisperso. Em uma modalidade, o polímero de PEG (ou PEO) é conjugado ao terminal N das variantes de CNP.

[0551] A invenção compreende o uso de polímeros hidrofílicos ou solúveis em água (por exemplo, PEG) que podem variar em tipo (por exemplo, homopolímero ou copolímero; copolímero aleatório, alternado ou em bloco; linear ou ramificado; monodisperso ou polidisperso), ligação (por exemplo, ligação hidrolisável ou estável tal como, por exemplo, ligação amida, imida, amina, alquileno ou éster), sítio de conjugação (por exemplo, no terminal N e/ou terminal C, preferivelmente não em nenhum dos resíduos na região ciclizada de CNP (correspondendo aos resíduos 6-22 de CNP22)) e comprimento (por exemplo, de a partir de cerca de 0,2, 0,4 ou 0,6 kDa a cerca de 2, 3, 4 ou 5 kDa). O polímero hidrofílico ou solúvel em água pode ser conjugado ao peptídeo CNP por meio de química baseada em N-hidróxi succinimida (NHS) ou aldeído ou outra química, como é conhecido na técnica. Tais variantes de CNP podem ser geradas usando, por exemplo, wtCNP22 (2,2 kDa), CNP17 retendo apenas a região ciclizada (resíduos 6-22) de wtCNP22, variantes de CNP tendo uma extensão de aminoácido no terminal N e/ou terminal C de CNP22 ou CNP17, ou variantes tendo substituições, adições e/ou deleções de aminoácido tais como, por exemplo, 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) e ER-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 39). Em uma modalidade, as variantes de PEG-CNP tendo uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, contêm uma porção de PEG (ou PEO) monodispersa, linear, conjugada ao terminal N e/ou terminal C através de química baseada em NHS ou aldeído, ou uma porção PEG de dois braços ou três braços conjugada no terminal N e/ou terminal C através de química baseada em NHS. A invenção também compreende variantes de PEG-CNP negativamente carregadas projetadas para excreção renal reduzida incluindo, mas não limitado a, compostos carboxilados, sulfatados e fosforilados (Caliceti, *Adv. Drug Deliv. Rev*., 55: 1261-77 (2003); Perlman, *J. Clin. Endo. Metab*., 88: 3227-35 (2003); Pitkin, *Antimicrob. Ag. Chemo*., 29: 440-444 (1986); Vehaskari, *Kidney Int'l,* 22: 127-135 (1982)). Em uma modalidade, a porção de PEG (ou PEO) contém grupo(s) carboxila(s), grupo(s) sulfato e/ou grupo(s) fosfato.

[0552] Em outra modalidade, as porções de PEG (ou PEO) conjugadas ao terminal N, terminal C e/ou sítio(s) interno(s) de variantes de CNP descritos aqui contêm um ou mais grupos funcionais que são positivamente carregados sob condições fisiológicas. Tais porções de PEG são projetadas, *inter alia*, para aperfeiçoar a distribuição de tais variantes de CNP PEGuiladas a tecidos de cartilagem. Em uma modalidade, tais porções de PEG contêm um ou mais grupos amino primários, *sec*undários ou terciários, grupos amônio quaternários e/ou outros grupos contendo amina (por exemplo, ureia).

[0553] Em uma modalidade, a invenção compreende CNP22 ou variantes do mesmo conjugados através de química baseada em NHS ou aldeído a PEG (ou PEO) da fórmula $(CH_2CH_2O)_n$, onde n é um inteiro de a partir de cerca de 6 a cerca de 100 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,3 kDa a cerca de 5 kDa. Em outra modalidade, n é

um inteiro de a partir de cerca de 12 a cerca de 50 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 2,5 kDa. Em ainda outra modalidade, n é de a partir de cerca de 12 a cerca de 24 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 1,2 kDa. Em ainda outra modalidade, o grupo hidroxila terminal do polímero de PEG é capeado com um grupo não reativo. Em uma modalidade particular, o grupo de capeamento de extremidade é um grupo alquila, por exemplo, um grupo alquila inferior tal como metila.

[0554] Em uma modalidade adicional, a invenção provê variantes de CNP tendo uma ou mais ligações peptídeo ou isósteres de ligação a peptídeo que têm susceptibilidade reduzida à clivagem por peptidases incluindo endopeptidase neutra (NEP). NEP é uma endopeptidase dependente de zinco ligada à membrana que cliva uma ligação de peptídeo substrato na extremidade amino de resíduos hidrofóbicos grandes. Desta maneira, modificação de uma ligação peptídeo em um sítio de clivagem por NEP para uma ligação peptídeo não natural ou não peptídeo pode precludir ou diminuir a eficiência de clivagem por NEP.

[0555] Para ANP e CNP, clivagem por NEP é relatada ocorrer primeiro na ligação Cys6-Phe7 dentro da região ciclizada, então em outro local no restante das estruturas. Para BNP, clivagem é relatada ocorrer primeiro no terminal N do peptídeo, então dentro da estrutura cíclica. Embora o sítio de clivagem por NEP primário em CNP seja relatado ser a ligação Cys6-Phe7, quando wtCNP22 foi exposto à digestão por NE por 2,5 minutos *in vitro*, todos os sítios possíveis foram inesperadamente hidrolisados, com as ligações de peptídeo Cys6-Phe7 e Gly8-Leu9 sendo ligeiramente mais lábeis, conforme descrito no Exemplo 2.

[0556] Especificidade de substrato de NEP é principalmente determinada por dois subsítios de ligação de substrato, S1' e S2' (Oefner

e outros, *J. Mol. Biol.* 296:341-349 (2000)). O sítio S1' aceita um resíduo P1' hidrofóbico grande cuja ligação peptídeo N-terminal é submetida à hidrólise (por exemplo, Phe, Leu, Ile e Met). O sítio S2' geralmente prefere um resíduo menor, chamado P2' (por exemplo, Gly ou Ser). No caso de CNP, Phe7 é relatado ser o resíduo P1' preferido para o sítio S1' de NEP, enquanto Gly8 é o resíduo P2' preferido para o sítio S2'. Devido ao fato desses dois subsítios poderem juntos acomodar apenas um certo tamanho de cadeia lateral total, qualquer aumento no tamanho total dos resíduos P1'-P2' de CNP pode potencialmente romper a ligação de NEP. Por exemplo, adição de um átomo de cloro na posição 3 do anel aromático Phe7 P1' (isto é, 3-Cl-Phe7) pode potencialmente modificar (por exemplo, desestabilizar) interações entre CNP e os sítios de clivagem de NEP, por exemplo, no subsítio S1'. Adição de um grupo butila terciário ao resíduo P2' menor Gly8 (isto é, tBu-Gly8) pode potencialmente romper a interação entre CNP e o subsítio S2'.

[0557] Desta maneira, em uma modalidade, variantes de CNP da invenção incluem CNP tendo um aumento no tamanho dos resíduos P1'-P2', tal como Phe7-Gly8, para interferir com reconhecimento de substrato no sítio de clivagem, desta maneira reduzindo a susceptibilidade à clivagem por NEP. Porções de aminoácidos naturais, aminoácidos não naturais e/ou peptidomiméticos substituem um ou mais resíduos hidrofóbicos P1' grandes incluindo, mas não limitado a, Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 e Leu20, e/ou um ou mais resíduos P2' menores incluindo, mas não limitado a, Cys6, Gly8, Gly15, Ser16 e Gly19.

[0558] A invenção compreende variantes de CNP compreendendo pelo menos um aminoácido modificado e/ou pelo menos uma ligação de peptídeo modificada, pelo menos um resíduo envolvido em reconhecimento de substrato e/ou clivagem por NEP, onde os aminoácidos modificados e as ligações de peptídeo modificadas podem ser amino-

ácidos naturais, aminoácidos não naturais, peptidomiméticos e/ou isósteres de ligação a peptídeo. Em uma modalidade, o sítio de clivagem de NEP em CNP entre Cys6 e Phe7 é modificado. Em uma modalidade relacionada, a ligação de peptídeo (-C(=O)-NH)- entre Cys6 e Phe7 é substituída com um dos isósteres de ligação a peptídeo que seguem:

[0559] $-CH_2-NH-$,

[0560] -C(=O)-N(R)-, onde o grupo amida é alquilado com qualquer um dos grupos R que seguem: metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila.

[0561] $-C(=O)-NH-CH_2-$,

[0562] $-CH_2-S-$,

[0563] $-CH_2-S(O)_n-$, onde n é 1 ou 2,

[0564] $-CH_2-CH_2-$,

[0565] -CH=CH-,

[0566] $-C(=O)-CH_2-$,

[0567] -CH(CN)-NH-,

[0568] $-CH(OH)-CH_2-$,

[0569] -O-C(=O)-NH-, ou

[0570] -NHC(=O)NH-.

[0571] Em outra modalidade, as variantes de CNP são representadas pela fórmula:

[0572] $(x)-Gly_1-Leu_2-Ser_3-Lys_4-Gly_5-(b)_6-(c)_7-(d)_8-Leu_9-Lys_{10}-Leu_{11}-Asp_{12}-Arg_{13}-Ile_{14}-Gly_{15}-Ser_{16}-Met_{17}-Ser_{18}-Gly_{19}-Leu_{20}-Gly_{21}-Cys_{22}-(z)$ (SEQ ID Nº: 90), onde:

[0573] (x) e (z) independentemente podem estar ausentes ou podem ser selecionados do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tal como, por exemplo, bisfosfonato; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso ou cartilagem tais como, por exemplo, polyAsp e polyGlu; sequências de aminoácido

derivadas de domínios de direcionamento a osso de proteínas do osso tais como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína (Wang e outros, *Adv. Drug Delivery Rev.,* 57: 1049-76 (2005)); moléculas poliméricas e não poliméricas que reduzem excreção renal tais como, por exemplo, PEGs negativamente carregadas; e polímeros naturais (por exemplo, aqueles contendo aminoácidos, ácidos graxos e/ou carboidratos) e polímeros sintéticos (por exemplo PEGs) que aumentam a resistência à variante de CNP à degradação por NEP através do aumento da massa total da variante de CNP às faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa;

[0574] (b) e (c) podem ser Cys6 e Phe7 do tipo selvagem, outro aminoácido natural ou um aminoácido não natural ou podem conter um isóstere de ligação de peptídeo conforme aqui descrito para aumentar a resistência à clivagem por NEP; e

[0575] (d) pode ser o Gly8 do tipo selvagem ou pode ser um aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural maior (por exemplo, t-Bu-Gly) para reduzir ligação a NEP.

[0576] Em uma modalidade, tais variantes de CNP contêm pelo menos um aminoácido modificado em (b), (c) e/ou (d).

[0577] Outras ligações de peptídeo dentro de CNP pode ser clivadas mesmo se CNP22 ou uma variante do mesmo tiver uma ligação de peptídeo resistente à NEP ou isóstere de ligação de peptídeo em Cys6-Phe7, incluindo as ligações Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17, e Gly19-Leu20. Desta maneira, a invenção compreende variantes de CNP tendo isóstere(s) de ligação a peptídeo em um ou mais outros sítios de clivagem por NEP em adição à ligação Cys6-Phe7, onde os isósteres de ligação de peptídeo inclue aqueles descritos aqui.

[0578] Em outra modalidade, a invenção compreende variantes de

CNP tendo um análogo de cisteína em Cys6 e/ou Cys22 incluindo, mas não limitado a, homocisteína, penicilamina, ácido 2-mercaptopropiônico e ácido 3-mercaptopropiônico. Em uma modalidade, tais variantes de CNP têm um domínio cíclico formado por uma ligação dissulfeto entre o Cys6 ou análogo e Cys22 ou análogo do tipo selvagem.

[0579] Em ainda outra modalidade, um ou mais resíduos de CNP22 ou uma variante do mesmo, até todos os resíduos, são substituídos com um D-aminoácido. Substituição de um L-aminoácido com um D-aminoácido essencialmente move a cadeia lateral cerca de 120 graus de sua posição original, desta maneira potencialmente rompendo a ligação do peptídeo CNP à NEP. Em uma modalidade específica, L-Phe em Phe7 é substituído com seu D-enantiômero, D-Phe.

[0580] Em ainda outra modalidade, um beta-aminoácido tal como, por exemplo, ácido 3-amino-2-fenilpropiônico (ou 2-fenil-beta-alanina), substitui o alfa-aminoácido do tipo selvagem Phe7. Uso de um beta-aminoácido aumenta eficazmente o comprimento da estrutura principal do peptídeo em uma unidade metileno. Resistência à protease pode resultar da mudança em conformação de substrato ou da distância aumentada entre as cadeias laterais de aminoácido.

[0581] Exemplos não limitantes de variante de CNP22 tendo um alfa-aminoácido não natural, um beta-aminoácido ou um isóstere de ligação de peptídeo incluem:

[0582] GLSKGC($CH_2NH$)FGLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo A**) (SEQ ID Nº: 56),

[0583] GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo B**) (SEQ ID Nº: 57),

[0584] GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo E**) (SEQ ID Nº:136),

[0585] GLSKGCF-(tBu-Gly)-LKLDRIGSMSGLGC (**Análogo F**)

(SEQ ID Nº: 58),

[0586] GLSKGC-(3-Cl-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo G**) (SEQ ID Nº:137), e

[0587] GLSKGC-[$NHCH_2CH(Ph)CO$]-GLKLDRIGSMSGLGC (**Análogo H**, formado usando ácido 3-amino-2-fenilpropiônico) (SEQ ID Nº: 59).

[0588] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas aqui em geral, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, projetadas para resistência aumentada à degradação por NEP, e são representadas pela fórmula:

[0589] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-(a)$_4$-$Gly_5$-(b)$_6$-(c)$_7$-(d)$_8$-(e)$_9$-(f)$_{10}$-(g)$_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-(h)$_{14}$-$Gly_{15}$-$Ser_{16}$-(i)$_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-(j)$_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z) (SEQ ID Nº: 46), onde:

[0590] (x) e (z) independentemente podem estar ausentes ou podem ser selecionados do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tal como, por exemplo, bisfosfonatos; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso ou cartilagem tais como, por exemplo, polyAsp e polyGlu; sequências de aminoácido derivadas de domínios de direcionamento a osso de proteínas do osso tais como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína; porções poliméricas e não poliméricas que reduzem a excreção renal tais como, por exemplo, PEGs negativamente carregados; polímeros contendo, por exemplo, aminoácidos, ácido hidrofóbicos e/ou carboidratos; e polímeros hidrofílicos sintéticos tais como, por exemplo, PEGs;

[0591] (a) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral, incluindo, mas não

limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (a) é Arg;

[0592] (b) é selecionado do grupo consistindo em Cys e isósteres de ligação a peptídeo entre Cys6 e Phe7 tal como, por exemplo, Cys-$CH_2$-NH;

[0593] (c) é selecionado do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe. Ácido 3-amino-2-fenilpropiônico; derivados N-alquilados de Phe, onde o grupo N-alquila é metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila; e análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto, meta e/ou para do anel benzeno do análogo de Phe são substituídas com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi de cadeia reta ou ramificada, halo-$C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{3-10}$ cicloalquila, heterociclila, $C_{6-14}$ arila ou heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalanina, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalanina) ou onde o anel benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e 2-naftilalanina) ou com um grupo heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilalanina, tienilalanina e furilalanina);

[0594] (d) é selecionado do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val e Asn;

(e) é selecionado do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0595] (f) pode ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou pode ser substituído com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não tem uma amina primária reativa em uma cadeia lateral incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou

Glu, onde em uma modalidade (f) não é Arg;

[0596] (g) é selecionado do grupo consistindo em Leu e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0597] (h) é selecionado do grupo consistindo em Ile, tBu-Gly e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[0598] (i) é selecionado do gruo consistindo em Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminobutírico (Abu) e ácido 2-aino-isobutírico (Aib); e

[0599] (j) é selecionado do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, *terc*-butil-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu.

[0600] Em outra modalidade, as variantes de CNP têm uma massa total caracterizada pelas faixas descritas geralmente aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, projetadas para resistência aumentada à clivagem por NEP, e são representadas pela fórmula:

[0601] (x)-$Gly_1$-$Leu_2$-$Ser_3$-(a)$_4$-$Gly_5$-(b)$_6$-(c)$_7$-(d)$_8$-(e)$_9$-(f)$_{10}$-(g)$_{11}$-$Asp_{12}$-$Arg_{13}$-(h)$_{14}$-(i)$_{15}$-$Ser_{16}$-(j)$_{17}$-$Ser_{18}$-$Gly_{19}$-(k)$_{20}$-$Gly_{21}$-$Cys_{22}$-(z)(SEQ ID Nº:143), onde:

[0602] (x) e (z) independentemente podem estar ausentes ou podem ser selecionados do grupo consistindo em compostos de direcionamento a osso sintéticos tais como, por exemplo, bisfosfonatos; sequências de aminoácido úteis em direcionamento a osso ou cartilagem tais como, por exemplo, polyAsp e polyGly; sequências de aminoácido derivadas de domínios de direcionamento a osso de proteínas do osso e seus derivados, tais como, por exemplo, proteínas de fusão ou sequências de peptídeo de osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, etc; porções que reduzem a excreção renal incluindo, mas não limitado a, polímeros hidrofílicos ou solúveis em água tais como, por exemplo, moléculas de PEG carregadas; e porções compreendendo, por exem-

plo, PEGs, aminoácidos, carboidratos e/ou ácidos hidrofóbicos;

[0603] (a) podem ser o Lys do tipo selvagem nesta posição ou podem ser substituídos com uma substituição de aminoácido conservativa ou um aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não tenha uma amina primária reativa em uma cadeia lateral incluindo, mas não limitado a, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln, Ser ou Glu, onde em uma modalidade (a) é Arg;

[0604] (b) são selecionados do grupo consistindo em Cys e isósteres de ligação de peptídeo entre Cys6 e Phe7 tal como, por exemplo, Cys-$CH_2$-NH;

[0605] (c) são selecionados do grupo consistindo em L-Phe; D-Phe; ácido 3-amion-2-fenilpropiônico; derivados N-alquilados de Phe, onde o grupo N-alquila é metila, etila, n-propila, isopropila, ciclopropila, n-butila, isobutila, *sec*-butila ou *terc*-butila; ou análogos de Phe, onde uma ou mais posições orto, meta e/ou para do anel benzeno do análogo de Phe são substituídas com um ou mais substituintes selecionados do grupo consistindo em halogênio, hidroxila, ciano, $C_{1-6}$ alquila de cadeia reta ou ramificada, $C_{1-6}$ alcóxi de cadeia reta ou ramificada, halo-$C_{1-6}$-alqila de cadeia reta ou ramificada, $C_{3-10}$ cicloalquila, $C_{6-14}$ arila, heterociclila e heteroarila (exemplos incluem, mas não estão limitados a, tirosina, 3-clorofenilalanina, 2,3-cloro-fenilalanina, 3-cloro-5-flúor-fenilalanina, 2-cloro-6-flúor-3-metil-fenilalanina) ou onde o anel benzeno do análogo de Phe pode ser substituído com outro grupo arila (exemplos não limitantes incluem 1- e 2-naftilalanina) ou com um grupo heteroarila (exemplos não limitantes incluem piridilamina, tienilamina e furilalanina);

[0606] (d) são selecionados do grupo consistindo em Gly, *terc*-butil-Gly, Thr, Ser, Val e Asn;

[0607] (e) são selecionados do grupo consistindo em Leu, Ser, Thr e isóesteres de ligação a peptídeo tais como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0608] (f) são selecionados do grupo consistindo em Lys, Arg, Gly, 6-hidróxi-norleucina, citrulina (Cit), Gln e Ser;

[0609] (g) são selecionados do grupo consistindo em Leu, Asn e isósteres de ligação de peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu;

[0610] (h) são selecionados do grupo consistindo em Ile, *terc*-butil-Gly (tBu-Gly), Asn e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Ile;

[0611] (i) são selecionados do grupo consistindo em Gly, Arg, Ser e Asn;

[0612] (j) são selecionados do grupo consistindo em Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, ácido 2-aminoisobutírico (Abu) e ácido 2-amino-isobutírico (Aib); e

[0613] (k) são selecionados do grupo consistindo em Leu, norleucina (Nle), homoleucina (Hleu), Val, *terc*-butil-Ala (rBu-Ala), Arg, Thr, Ser e isósteres de ligação a peptídeo tal como, por exemplo, N-Me-Leu.

[0614] Para aperfeiçoar a administração de variantes de CNP aos sítios alvo de distúrbios relacionados a osso (por exemplo, displasias esqueléticas), as variantes de CNP podem ser ligadas (por exemplo, no terminal N e/ou terminal C) a porções de direcionamento a osso ou cartilagem. Exemplos não limitantes de porções de direcionamento a osso ou cartilagem incluem bisfosfonatos; hidroxiapatita; glucosamina; colágeno (por exemplo, colágeno tipo X); polyAsp; polyGlu; e sequências de aminoácido derivadas de domínios de direcionamento a osso de proteínas do osso tais como, por exemplo, osteocrina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína.

[0615] Em adição a ser menos suscetível à clivagem por NEP, as variantes de CNP potencialmente têm afinidade reduzida para o receptor de excreção NPR-C, enquanto retendo a funcionalidade de CNP. Além da degradação mediada por NEP, a meia-vida de CNP22 é influ-

enciada pelo receptor de excreção, NPR-C, que compartilha 58% de homologia de sequência com o domínio de ligação do peptídeo extracelular de NPR-B. CNP22 se liga firmemente não apenas a NPR-B (afinidade de 7-30 pM), mas também NPR-C (11-140 pM) (Bennett, B.D. e outros, *J. Biol. Chem*., 266: 23060-67 (1991); Koller K.J. & Goeddel, D.V., *Circulation*, 86: 1081-88 (1992); Suga, S. e outros., *Endocrinology*, 130: 229-39 (1992)). Embora a estrutura de cristal de NPR-B tenha que ser ainda relatada, homologia de sequência bem como similaridades entre as estruturas de cristal NPR-C e NPR-A (He, X. L. e outros, *Science*, 293(5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. e outros., *J. Biol. Chem*., 279(27): 28625-31 (2004); He, X. L., *J. Mol. Biol.*, 361(4): 698-714 (2006)) sugerem que NPR-B provavelmente assume uma dobra estrutural geral similar.

[0616] Desta maneira, um modelo de homologia de NPR-B foi construído com base em alinhamento de sequência baseado em estrutura e estruturas cristalográficas dos sistemas relacionados que seguem: CNP ligado a NPR-C, ANP ligado a NPR-A e ANP ligado a NPR-C (He, X.L. e outros, *Science*, 293(5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. e outros, *J. Biol. Chem*., 279(27): 28625-31 (2004); He, X.L., *J. Mol. Biol.*, 361(4): 698-714 (2006)). Com base em observações que o receptor parece determinar a conformação de peptídeo ligado, e que NPR-B lembra mais NPR-A com relação à estrutura primária e propriedades funcionais, o modelo de homologia de NPR-B/CNP foi construído com a estrutura de cristal NPR-A/ANP como um modelo. Dados de sinalização publicados de variantes de CNP (Patente U.S. Nº 5.434.133 e Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2004/0138134 A1) e de variantes de ANP funcionais que não se ligam mais a NPR-C (Cunningham, EMBO 13(11) 2508-15, 1994) foram usados para refinar e interpretar o modelo NPR-B/CNP.

[0617] A presente invenção compreende variantes de CNP proje-

tadas para seletividade para NPR-B aperfeiçoada com base em um modelo estrutural baseado em homologia do complexo NPR-B/CNP. Combinando os dados estruturais experimentais e computacionais de peptídeos natriuréticos ligados aos vários receptores com os dados funcionais publicados, variantes de CNP foram geradas, as quais continuam a se ligar a NPR-B, mas podem ter afinidade potencialmente reduzida para o receptor de excreção NPR-C. Por exemplo, NPR-C tem uma inserção única em uma estrutura de alça no sítio de ligação a peptídeo, pondo seus resíduos de alça mais próximo de tais resíduos de peptídeo como CNP Gly8 (ou ANP Gly9), comparado com respectivos resíduos de alça em NPR-A e NPR-B. Estudos anteriores indicaram que mutação de G9T em ANP contribui para afinidade reduzida para NPR-C, desta maneira aperfeiçoando a seletividade de NPR-A (Cunningham, *EMBO J.,* 13(11): 2508-15 (1994)). Desta maneira, variantes de CNP foram geradas para substituir o resíduo Gly8 correspondente com um resíduo maior (Ser, Val, Thr ou Asn) para romper a ligação de CNP a NPR-C sem afetar sua ligação a NPR-F. Ainda, uma ou mais mutações foram introduzidas na extremidade C-terminal de CNP, compreendendo Gly15 a Gly21, que é prevista interagir com resíduos específicos de receptor, com base nas análises estruturais detalhadas dos complexos receptor/peptídeo. Por exemplo, uma mutação G19R em CNP22 não resulta em uma perda significante de atividade de sinalização de NPR-B. Esta mutação, no entanto, não pode ser modelada na estrutura de cristal disponível de NPR-C/CNP sem alterar as conformações de resíduos vizinhos. Essas observações sugerem que a mutação G19R pode romper seletivamente a ligação de CNP a um receptor particular, tal como NPR-C.

[0618] Em uma modalidade, as variantes de CNP têm substituição(ões) em um ou mais sítios de Gly nas posições 1, 5, 8, 15, 19 e 21 para reduzir a flexibilidade conformacional e então aumentar a especi-

ficidade do receptor. Análises comparativas de estruturas de cristal de ANP ligadas a NPR-C e NPR-A (Ogawa, H. e outros, *J. Biol. Chem*., 279: 28625-31 (2004); He, X.L., *J. Mol. Biol.,* 361: 698-714 (2006)) indicam que a flexibilidade conformacional de ANP pode desempenhar um papel importante na determinação da seletividade do receptor.

[0619] Em uma modalidade, variantes de CNP funcionais com afinidade potencialmente reduzida para NPR-C têm uma ou mais das substituições de aminoácido que seguem: 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 e G21R. Em uma modalidade, as variantes de CNP têm substituições multiponto nas posições 1, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 e/ou 21 e podem ter opcionalmente modificações em qualquer uma das outras posições na sequência de peptídeo da variante.

[0620] Em uma modalidade adicional, as variantes de CNP descritas aqui podem ser conjugadas a porções, até uma massa total caracterizada pelas faixas descritas em geral aqui, por exemplo, de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, no terminal N, no terminal C e/ou sítio interno, para facilitar o direcionamento a osso/cartilagem, reduzir a excreções por NPR-C e renal, aumentar a resistência à degradação por NEP e/ou aperfeiçoar a funcionalidade de CNP. Em uma modalidade, as variantes de CNP não são conjugadas a uma porção polimérica em um sítio dentro da região cíclica (correspondendo a Cys6 até Cys22 de CNP22). Exemplos não limitantes de porções poliméricas ou não poliméricas que podem ser conjugadas às variantes de CNP incluem compostos de direcionamento a osso sintéticos tais como, por exemplo, bisfosfonatos; sequências de peptídeo de direcionamento a osso/cartilagem tais como, por exemplo, polyAsp e polyGlu; sequências de peptídeo derivadas de domínios de direcio-

namento a osso de proteínas do osso tais como, por exemplo, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína; sequências de peptídeo derivadas dos domínios funcionais das proteínas morfogenéticas do osso tais como, por exemplo, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 e BMP8a; sequências de peptídeo derivadas de polipeptídeos de origem natriurética tais como, por exemplo, NPPC, ANP e BNP; outras porções poliméricas ou não poliméricas naturais tais como, por exemplo, carboidratos, ácidos graxos e fosfolipídeos; polímeros hidrofílicos sintéticos biocompatíveis tal como, por exemplo, PEG (ou PEO); porções poliméricas ou não poliméricas hidrofóbicas tais como, por exemplo, ácido heptanoico e ácido pentanoico; e combinações dos mesmos.

[0621] As variantes de CNP descritas aqui podem ter atividade funcional substancialmente similar ou melhor do que CNP22, por exemplo, com relação à estimulação de produção e sinalização de cGMP. Em uma modalidade, as variantes de CNP *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 50% do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM). Em certas modalidades, as variantes de CNP retêm pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% da atividade de estimulação de cGMP de CNP22 do tipo selvagem *in vitro* ou *in vivo*. Em outra modalidade, as variantes de CNP têm atividade de estimulação de cGMP aperfeiçoada comparado com CNP22. Em certas modalidades, as variantes de CNP *in vitro* ou *in vivo* estimulam a produção de pelo menos cerca de 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% ou mais do nível de cGMP produzido sob a mesma concentração de wtCNP22 (por exemplo, 1 uM).

[0622] Opcionalmente excluídos da presente invenção estão qualquer um dos peptídeos natriuréticos (por exemplo, CNP), fragmentos e variantes especificamente revelados, e qualquer um dos peptídeos na-

triuréticos (por exemplo, CNP), fragmentos e variantes realmente produzidos, em qualquer uma das publicações anteriores referidas aqui incluindo, mas não limitado a, U.S. 5.434.133, U.S. 6.034.231, U.S. 6.020.168, U.S. 6.743.425, U.S. 7.276.481, WO 94/20534, WO 02/047871, WO 2005/098490, WO 2004/047871, EP 0497368, EP 0466174 e Furuya e outros, *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 183: 964-969 (1992)). Todos os documentos são incorporados aqui a título de referência em sua totalidade.

[0623] Em uma modalidade, a presente invenção exclui opcionalmente todos CNP-53 do tipo selvagem, CNP-22 do tipo selvagem, CNP-17 do tipo selvagem, BNP do tipo selvagem e ANP do tipo selvagem conhecidos de origem humana e não humana. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção exclui opcionalmente CNP-17 humano, CNP-22 humano, CNP-22 de galinha (correspondendo a hCNP-22(Lei9Val), CNP-22 de truta e enguia (correspondendo a hCNP-22 (Leu2Trp, Ser3Asn, Lys4Arg)), CNP22-I de sapo (correspondendo a hCNP-22(Leu2Tyr, Lys4Arg, Leu9Val, Ser16Ala, Met17Phe)), CNP22-II de sapo (correspondendo a hCNP-22(Leu2Thr, Ser16Ala)), CNP-53 humano e CNP-53 de porco e rato (correspondendo a hCNP-53(Gln17His, Ala28Gly)). Em outra modalidade, a invenção opcionalmente exclui fragmentos de NPPC, proCNP e CNP-53 que são produzidos através da clivagem proteolítica *in vivo* em animais humanos e não humanos. Em ainda outra modalidade, estão opcionalmente excluídos da invenção os fragmentos truncados que seguem de CNP-53 humano: CNP-50, CNP-46, CNP-44, CNP-39, CNP-30, CNP-29, CNP-28, CNP-27 e CNP-26.

[0624] Em uma modalidade adicional, a presente invenção opcionalmente exclui peptídeos CNP e fragmentos dos mesmos isolados ou buscados das espécies de tubarão *Triakis scyllia* e *Scyliorhinus canicula* (vide, por exemplo, M. Takano *e outros*, *Zool. Sci.,* 11: 451-

454(1994)), incluindo:

[0625] RLLKDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRI-GAMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID Nº: 204);

[0626] LKDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID Nº: 205);

[0627] KDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID Nº: 206); e

[0628] GPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (SEQ ID Nº: 207).

[0629] Em outra modalidade, estão opcionalmente excluídos da invenção peptídeos CNP e seus fragmentos isolados ou buscados da espécie de tubarão Lamna ditropis (vide, por exemplo, M. Takano e outros, Zool. Sci., 11: 451-454(1994)), incluindo:

[0630] RLLKDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRI-GAMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID Nº: 208);

[0631] LKDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-39) (SEQ ID Nº: 209);

[0632] KDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-38) (SEQ ID Nº: 210);

[0633] FKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-29) (SEQ ID Nº: 211); e

[0634] GPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (SEQ ID Nº: 212).

[0635] Em ainda outra modalidade, estão opcionalmente excluídos da invenção peptídeos CNP e seus fragmentos isolados da espécie de tubarão Squalus acanthias (vide, por exemplo, M. Takano e outros, Zool. Sci., 11: 451-454(1994)), incluindo:

[0636] RLLQDLSNNPLRFKGRSKKGPSRSCFGLKLDRI-GAMSGLGC (CNP-41) (SEQ ID Nº: 213); e

[0637] GPSRSCFGLKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (SEQ ID Nº:

214).

[0638] Em uma modalidade adicional, a presente invenção exclui opcionalmente peptídeos CNP isolados de peixe-arroz (medraka) e peixe-balão (puffer), chamados "CNP-1", "CNP-2", "CNP-3" e "CNP-4" em K. Inoue *e outros, Proc. Nat. Acad. Sci.,* 100(17): 10079-10084 (2003):

[0639] GWNRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-1 de peixe-arroz e peixe-balão) (SEQ ID Nº: 215);

[0640] PMVAGGGCFGMKMDRIGSISGLGC (CNP-2 de peixe arroz) (SEQ ID Nº: 216);

[0641] GRSSMVGGRGCFGMKIDRIGSISGLGC (CNP-2 de peixe-balão) (SEQ ID Nº: 217);

[0642] GGMRSCFGVRLERIGSFSGLGC (CNP-3 de peixe-arroz) (SEQ ID Nº: 218);

[0643] GGLRSCFGVRLARIGSFSGLGC (CNP-3 de peixe-balão) (SEQ ID Nº: 219);

[0644] GGSTSRSGCFGHKMDRIGTISGMGC (CNP-4 de peixe-arroz) (SEQ ID Nº: 220); e

[0645] ggssrsgcfghkmdrigtisgmgc (CNP-4 de peixe-balão) (SEQ ID Nº: 221).

[0646] Em uma modalidade adicional, estão opcionalmente excluídos da invenção CNP-39 isolados de veneno de platypus e o fragmento de CNP-22 do mesmo, chamados "ovCNP-39" e "ovCNP39(18-39) em G. de Plater e outros, Toxicon., 36(6): 847-857 (1998):

[0647] LLHDHPNPRKYKPANKKGLSKGCFGLKLDRIGSTSGLGC (ovCNP-39) (SEQ ID Nº: 222); e

[0648] GLSKGCFGLKLDRIGSTSGLGC (ovCNP-39(18-39)) (SEQ ID Nº: 223).

[0649] Em outra modalidade, a presente invenção exclui opcionalmente os peptídeos que seguem conforme especificamente revela-

do na US 2007/0197434:

[0650] 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);

[0651] 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);

[0652] 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);

[0653] 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);

[0654] 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); e

[0655] 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).

[0656] Em ainda outra modalidade, a invenção opcionalmente exclui peptídeos de SEQ ID Nº:10, revelados em geral na US 2007/0197434, onde tais peptídeos são variantes de CNP-17 tendo certas substituição(ões) de aminoácido natural na(s) posição(ões) 4, 5, 6, 11, 12, 14 e/ou 15.

[0657] Em ainda outra modalidade, estão opcionalmente excluídos da invenção peptídeos correspondendo a hCNP-53(Ser47Ala), hCNP-53(Met48Gln), hCNP-53(Met48Ala) e hCNP-53(C-term.)–Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr.

[0658] Em uma modalidade, a presente invenção exclui opcionalmente os peptídeos das SEQ ID NOs:1-4 e 6-71 conforme especificamente revelado na US 7.276.481. Em outra modalidade, a invenção opcionalmente exclui peptídeos da SEQ ID Nº:5, revelados genericamente na U.S. 7.276.481, onde tais peptídeos são variantes de CNP17 tendo pelo menos uma substituição de aminoácido natural em Leu9, Lys10, Leu11, Ser16, Met17, Gly19 e/ou Leu20. Em ainda outra moda-

lidade, estão opcionalmente excluídas variantes de CNP17 onde CNP17 ou variantes do mesmo contêm N-Me-Phe7 ou N-Me-Phe7 e N-Me-Leu11. Em uma modalidade adicional, a invenção opcionalmente exclui variantes de CNP17 de SEQ ID Nº:5, conforme revelado na U.S. 7.276,481, que são fundidas ou conjugadas a hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento do tipo insulina 1 (IGF-1) ou hormônio da tireoide (TH). Em ainda outra modalidade, estão opcionalmente excluídas variantes de CNP22 onde CNP22 é fundido a GH, IGF-1 ou TH ou ligado a GH, IGF-1 ou TH através de um ligante (por exemplo, um ligante de peptídeo). Em ainda outra modalidade, estão opcionalmente excluídas variantes de CNP17 onde CNP17 ou suas variantes são conjugados à biotina ou fluoresceína no terminal N ou no terminal C.

[0659] Em uma modalidade adicional, a presente invenção opcionalmente exclui os peptídeos dos Compostos Nos. 1-27 e SEQ ID NOs: 1-17, 22-24, 30, 31 e 40-42 conforme especificamente revelado na U.S. 5.434.133. Em outra modalidade, a invenção exclui opcionalmente peptídeos de SEQ ID NOs:18-21 e 25-29, revelados genericamente na U.S. 5.434.133. Em ainda outra modalidade, a invenção opcionalmente exclui os peptídeos de SEQ ID NOs: 1-4 e 9 conforme especificamente revelado no WO 94/20534.

[0660] Em algumas modalidades, no entanto, a invenção ainda compreende métodos de uso dos peptídeos natriuréticos (por exemplo, CNP), fragmentos e variantes opcionalmente excluídos dos mesmos, bem como composições farmacêuticas (incluindo composições farmacêuticas estéreis) compreendendo tais peptídeos natriuréticos (por exemplo, CNP), fragmentos e variantes.

[0661] C. Síntese e Purificação de Variantes de CNP

[0662] Em algumas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são produzidas através de expressão recombinante usando cer-

tas técnicas conhecidas no campo em certas modalidades. Vide, por exemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I e II, D. N. Glover, Ed. (1985); e *Current Protocols* in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

[0663] Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são produzidas através de um processo recombinante que compreende cultura em um meio de uma célula hospedeiro compreendendo um primeiro polinucleotídeo compreendendo um polipeptídeo variante de CNP ligado a um segundo polinucleotídeo codificando um peptídeo ou proteína clivável sob condições que resultam em expressão de um polipeptídeo de fusão codificado pelos polinucleotídeos, onde o polipeptídeo de fusão compreende o polipeptídeo variante de CNP diretamente ligado ao peptídeo ou proteína clivável ou indiretamente ligado ao mesmo através de um ligante. Em algumas modalidades, a célula hospedeiro é transformada com um vetor de expressão compreendendo o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo variante de CNP ligado ao polinucleotídeo codificando o peptídeo ou proteína clivável. Em certas modalidades, o polipeptídeo de fusão é expresso como uma proteína solúvel ou como um corpo de inclusão. O polipeptídeo de fusão expresso pode ser isolado de uma célula hospedeiro ou meio de cultura e o polipeptídeo de fusão isolado pode ser contatado com um agente de clivagem para liberar a variante de CNP.

[0664] Células hospedeiras usadas para produzir variantes de CNP podem ser células bacterianas, de levedura, inseto, vertebrado não mamífero ou mamífero. As células bacterianas incluem, sem limitação, linhagens e cepas celulares de E. coli. Exemplos não limitantes de linhagens e cepas de *E. coli* incluem BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [tam-

bém chamada C41(DE3)], C43 [também chamada C43(DE3)], Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX e Tuner(DE3). Em uma modalidade, variantes de CNP e proteínas de fusão de CNP são produzidas usando células BL21(DE3). Células de mamífero incluem, mas não estão limitadas a, células de hamster, macaco, chimpanzé, cachorro, gado, bovino, porcino, camundongo, rato, coelho, ovelha e humanas. As células hospedeiro podem ser células imortalizadas (uma linhagem de célula) ou células não imortalizadas (primárias ou secundárias) e podem ser qualquer uma de uma variedade de tipos de célula tais como, mas não limitado a, fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais (por exemplo, células epiteliais de mamífero, células epiteliais intestinais), células de ovário (por exemplo, células de ovário de hamster Chinês ou CHO), células endoteliais, células gliais, células neurais, elementos formados do sangue (por exemplo, linfócitos, células da medula óssea), condrócitos e outras células derivadas do osso e precursores desses tipos de célula somática. Células hospedeiro contendo o DNA ou RNA variante de CNP são cultivada s sob condições apropriadas para crescimento das células, expressão do DNA ou RNA e/ou identificação/seleção de células expressando a variante de CNP.

[0665] Em algumas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivadas por um período de tempo em uma temperatura de a partir de cerca de 10°C a cerca de 40°C ou de a partir de cerca de 20°C a cerca de 40°C ou de a partir de cerca de 30°C a cerca de 40°C. Em certas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivadas por um período de tempo em cerca de 20°C, 22°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C ou 37°C. Em certas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivadas por um período de tempo em cerca de 35°C ou 37°C.

[0666] Polinucleotídeos recombinantes codificando polipeptídeos variantes de CNP (incluindo proteínas de fusão de CNP) são expres-

sos em um vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo recombinante compreendendo sequências de controle de expressão operativamente ligadas a uma sequência de nucleotídeo a ser expressa. Um vetor de expressão compreende elementos de ação cis suficientes para expressão; outros elementos para expressão podem ser fornecidos pela célula hospedeiro ou sistema de expressão in vitro. Vetores de expressão incluem todos aqueles conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, cosmídeos, plasmídeos (por exemplo, nus ou contido em lipossomas) e vírus que incorporam o polinucleotídeo recombinante. O vetor de expressão é inserido em uma célula hospedeiro apropriada, através de transformação ou transfecção, para expressão do polinucleotídeo codificando o polipeptídeo (vide, por exemplo, Sambrook e outros (supra)).

[0667] Exemplos não limitantes de vetores de expressão compreendidos para produção de variantes de CNP, incluindo proteínas de fusão de CNP cliváveis, incluem pJexpress, pJexpress401, pJexpress404, pET-15b, pET-21a, pET-22b, pET-31b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pMAL-c2X, pQE-30, pET-SUMO e pTYB11. Expressão de construtos particulares pode gerar variantes de CNP solúveis (incluindo proteínas de fusão de CNP) ou variantes de CNP insolúveis (incluindo proteínas de fusão de CNP) na forma de corpos de inclusão.

[0668] Em algumas modalidades, expressão do(s) polinucleotídeo(s) codificando uma variante de CNP ou proteína de fusão de CNP é aumentada usando um vetor induzível por isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Em algumas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivada s por um período de tempo em uma temperatura de a partir de cerca de 10°C a cerca de 40°C ou de a partir de cerca de 20°C a cerca de 40°C ou de a partir de cerca de 30°C a cerca de 40°C na presença de IPTG. Em certas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivada s por um período de

tempo em cerca de 20°C, 22°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C ou 37°C na presença de IPTG. Em certas modalidades, as células hospedeiro são cultivadas ou cultivada s por um período de tempo em cerca de 35°C ou 37°C na presença de 1 mM de IPTG.

[0669] Em modalidades adicionais, as células hospedeiro são cultivada s com IPTG em uma concentração de a partir de cerca de 0,4 mM a cerca de 2 mM ou de a partir de cerca de 0,4 mM a cerca de 1,5 mM ou de a partir de cerca de 0,4 mM a cerca de 1 mM. Em certas modalidades, o IPTG está em uma concentração de cerca de 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 ou 2 mM. Em uma modalidade, a concentração de IPTG é cerca de 1 mM.

[0670] Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são recombinantemente expressas como proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo variante de CNP e uma proteína carreadora clivável ou marcador clivável (por exemplo, marcador de peptídeo), onde a proteína de fusão compreende o polipeptídeo variante de CNP diretamente ligado à proteína carreadora ou marcador clivável ou indiretamente ligado ao mesmo através de um ligante. Uso de uma proteína carreadora ou marcador facilita, por exemplo, detecção, isolamento e/ou purificação da proteína de fusão. Proteínas carreadoras e marcadores cliváveis incluem, mas não estão limitados a, marcadores de histidina (por exemplo, hexa-His), fator de transcrição humano TAF12 (TAF12), fragmentos de TAF12, domínio de dobra de TAF12 histona, mutantes de TAF12 e seus fragmentos, TAF12(C/A), TAF12(D/E), TAF12(4D/4E), TAF12(6D/6E), TAF12(10D/10E), TAF12(C/A & D/E), TAF12(C/A & 4D/4E), TAF12(C/A & 6D/6E), TAF12(C/A & 10D/10E); cetoesteroide isomerase (KSI); proteína de ligação à maltose (MBP); β-galactosidase (β-Gal); glutationa-S-transferase (GST); tiorredoxina (Trx); domínio de ligação à quitina (CBD); BMP-2, mutantes de BMP-2, BMP-2(C/A); SUMO; e seus mutantes e fragmentos.

[0671] Um construto de expressão pode expressar uma proteína de fusão compreendendo uma variante de CNP e uma proteína carreadora ou marcador. Em uma modalidade, o marcador é um domínio de ligação de ligante que pode ser usado para purificar a proteína de fusão através da aplicação da proteína de fusão a meios de separação contendo o ligante. Por exemplo, uma proteína de fusão compreendendo um domínio glutationa-S-transferase (GST) pode ser aplicada a uma coluna cromatográfica contendo meios de separação ligados à glutationa. Como outro exemplo, uma proteína de fusão compreendendo proteína de ligação à maltose (MBP) como um marcador pode ser aplicada a meios de separação contendo maltose. Como um exemplo adicional, uma proteína de fusão compreendendo um marcador de poli-histidina pode ser aplicada a uma coluna de níquel, com o que quelação do marcador de poli-histidina para a coluna de níquel facilita purificação da proteína de fusão. Em outra modalidade, o marcador é um ligante. Por exemplo, uma proteína de fusão pode compreender glutationa como um marcador e ser aplicada a uma coluna cromatográfica contendo meio de separação ligado à glutationa-S-transferase. Exemplos não limitantes de proteínas carreadores e marcadores para uso em proteínas de fusão incluem fator de transcrição humano TAF12 (TAF12), cetoesteroide isomerase (KSI), proteína de ligação à maltose (MBP), β-galactosidase (β-Gal), gutationa-S-transferase (GST), tiorredoxina (Trx), domínio de ligação à quitina (CBD), mutação de MBP-2 (BMPM), SUMO, CAT, TrpE, proteína *staphylococcal* A, proteínas *streptococcais*, proteína de ligação a amido, domínio de ligação à celulose de endoglucanase A, domínio de ligação à celulose de exoglucanase Cex, domínio de ligação à biotina, recA, Flag, poly(His), poly(Arg), poly(Asp), poly(Gln), poly(Phe), poly(Cys), proteína verde fluorescente, proteína vermelho fluorescente, proteína amarelo fluorescente, proteína ciano fluorescente, biotina, avidina, es-

treptavidina, epítopos de anticorpo e seus mutantes e fragmentos.

Para gerar a variante de CNP alvo, a proteína carreadora ou marcador pode ser clivado da proteína de fusão por meio de clivagem química, clivagem de protease ou autoclivagem de proteína. Agentes de clivagem químicos e proteolíticos exemplares (sítios de clivagem em parênteses) incluem, mas não estão limitados a, ácido fórmico (Asp-Pro), brometo de cianogênio (CNBr) (Met-X), hidroxilamina (Asn-Gly), Fator Xa (IEGR-X) (SEQ ID Nº:230), enterocinase (DDDDK-X) (SEQ ID Nº:231), ProTEV (EXXYXQ-G) (SEQ ID Nº:232) e protease SUMO. Devido à natureza dos tipos particulares de clivagem química, clivagem usando ácido fórmico pode gerar Pro-CNP, CNBr pode gerar CNP tendo substituição Met-para-Asn e hidroxilamina pode gerar Gly-CNP. Alternativamente, clivagem química ou com protease pode ser evitada usando construtos particulares (por exemplo, pET-21a-CNP) que expressam variantes de CNP não como proteínas de fusão. Expressão de pET-21a-CNO pode produzir Met-CNP. Ou certas proteínas de fusão (por exemplo, aquelas contendo inteína-CBD) podem sofrer autoclivagem para gerar CNP.

[0672] Em modalidades adicionais, uma proteína de fusão compreende um ligante de peptídeo clivável entre uma variante de CNP e uma proteína carreadora ou marcador (por exemplo, marcador de peptídeo). Em certas modalidades, o ligante de peptídeo clivável é selecionado do grupo consistindo em 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), e MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHTGDDDDKHMD (ligante pET-15b) (SEQ ID Nº: 95), onde X denota um aminoácido. Em algumas modalidades, o ligante de peptí-

deo clivável é clivado por um agente de clivagem selecionado do grupo consistindo em paládio, brometo de cianogênio (CNBr), ácido fórmico, hidroxilamina, clostripaína, trombina, trombina, quimiotripsina, tripsina, proteases tipo tripsina, carboxipeptidase, enterocinase (enteropeptidase), protease de Kex 2, protease de Omp T, protease de Fator Xa, subtilisina, proTEV, protease de SUMO, protease de V8, protease de HIV, protease de rinovírus, protease de furilisina, protease de IgA, protease de Pace humana, colagenase, protease de Nia, protease 2APro de poliovírus, protease 3C de poliovírus, genenase, furina, elastase, Proteinase K, pepsina, renina (quimiosina), proteases aspárticas microbianas, papaína, calpaína, quimiopapaína, dicina (ficaína), bromelaína (bromelase), catespisina B, caspases, termolisina, Endoprotease Arg-C, Endoprotease Glu-C, Endoprotease Lys-C, calicreína e plasmina.

[0673] Em certas modalidades, a proteína carreadora, marcador (por exemplo, marcador de peptídeo) ou ligante de peptídeo clivável é clivado usando ácido fórmico para liberar a variante de CNP da proteína de fusão. Em algumas modalidades, o ácido fórmico está em uma concentração de a partir de cerca de 1% a cerca de 20% ou de a partir de cerca de 1% a cerca de 15% ou de a partir de cerca de 2% a cerca de 15% ou de a partir de cerca de 1% a cerca de 10% ou de a partir de cerca de 2% a cerca de 10% ou de a partir de cerca de 1% a cerca de 5% ou de a partir de cerca de 2% a cerca de 5%. Em certas modalidades, o ácido fórmico está em uma concentração de cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% ou 15%. Em certas modalidades, o ácido fórmico está em uma concentração de cerca de 2%, 5% ou 10%.

[0674] Em modalidades adicionais, clivagem da proteína de fusão CNP na presença de ácido fórmico é conduzida em uma temperatura de a partir de cerca de 20°C a cerca de 80°C, ou de a partir de cerca

de 30°C a cerca de 75°C ou de a partir de cerca de 40°C a cerca de 75°C ou de a partir de cerca de 50°C a cerca de 75°C ou de a partir de cerca de 50°C a cerca de 70°C ou de a partir de cerca de 55°C a cerca de 70°C, ou de a partir de cerca de 50°C a cerca de 60°C. Em algumas modalidades, clivagem na presença de ácido fórmico é conduzida em cerca de 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 ou 80°C. Em certas modalidades, clivagem na presença de ácido fórmico é conduzida em cerca de 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ou 70°C. Em certas modalidades, clivagem na presença de ácido fórmico é conduzida em cerca de 55°C ou 70°C.

[0675] Em modalidades adicionais, clivagem da proteína de fusão CNP na presença de ácido fórmico é realizada por um período de tempo de a partir de cerca de 3 horas a cerca de 48 horas ou de a partir de cerca de 5 horas a cerca de 48 horas ou de a partir de cerca de 5 horas a cerca de 36 horas ou de a partir de cerca de 5 horas a cerca de 24 horas ou de a partir de cerca de 5 horas a cerca de 18 horas ou de a partir de cerca de 20 horas a cerca de 24 horas ou de a partir de cerca de 6 horas a cerca de 10 horas. Em certas modalidades, clivagem na presença de ácido fórmico é realizada por cerca de 5 horas, 6 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas, 20 horas ou 24 horas.

[0676] Em algumas modalidades, clivagem da proteína de fusão CNP é conduzida na presença de cerca de 2%, 5% ou 10% de ácido fórmico em cerca de 55°C por cerca de 20 horas a cerca de 26 horas ou em cerca de 60°C por cerca de 15 horas a cerca de 24 horas ou em cerca de 65°C por cerca de 10 horas a cerca de 21 horas ou cerca de 70°C por cerca de 6 horas a cerca de 18 horas. Em certas modalidades, clivagem da proteína de fusão CNP é conduzida na presença de cerca de 2% de ácido fórmico em cerca de 55°C por cerca de 20 horas a cerca de 24 ou 36 horas ou em cerca de 60°C por cerca de 15 horas a cerca de 24 horas ou em cerca de 65°C por cerca de 10 horas a cer-

ca de 18 horas ou em cerca de 70°C por cerca de 6 horas a cerca de 10 horas.

[0677] A presente invenção provê condições suaves para clivagem de proteínas de fusão CNP usando ácido fórmico para dar níveis altos de variantes de CNP. As condições descritas aqui para clivagem de proteínas de fusão usando ácido fórmico são também adequadas para clivagem de proteínas de fusão compreendendo polipeptídeos ou proteínas outros que não CNP, onde as proteínas de fusão contêm uma ligação de peptídeo Asp-Pro.

[0678] Em modalidades adicionais, proteínas de fusão de CNP solúveis ou corpos de inclusão de proteínas de fusão de CNP são tratados com um tampão e/ou um detergente antes da clivagem química (por exemplo, usando ácido fórmico) ou clivagem proteolítica da proteína de fusão de CNP. Exemplos não limitantes de tampões incluem B-PER II; B-PER-II diluído (por exemplo, diluição 1/20); B-PER; tampão de fosfato B-PER; tampões contendo Tris (por exemplo, Tris 25 mM, pH 7,5); tampões contendo Tris e NaCl (por exemplo, Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,9); e PBS. Em uma modalidade, o tampão é B-PER II. Exemplos não limitantes de detergentes incluem octilsacarose, Triton X-100, Tween-20, NP-40 e CA-630. O detergente pode estar em um tampão (por exemplo, detergente 1% em tampão de Tris 25 mM, pH 7,5). Em certas modalidades, o detergente é Triton X-100 ou CA-630.

[0679] É compreendido que qualquer um dos métodos e condições descritos acima pode ser usado em combinação com qualquer um dos outros métodos e condições descritos acima para gerar uma variante de CNP revelada aqui.

[0680] Em outras modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são sintetizadas usando um sintetizador de peptídeo e purificadas de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo, de acordo

com os métodos de Atherton e Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, IRL Press (Oxford, Inglaterra (1989)).

[0681] Os peptídeos podem ser sintetizados com base, por exemplo, na sequência de peptídeo de CNP que segue: $G^1$LS(K ou R)G$C^6F^7G^8$L(K ou R ou Nle ou 6-OH-Nle)LDRIGSMSGLG$C^{22}$.

[0682] Variantes de CNP exemplares incluem, mas não estão limitadas a:

[0683] **Análogo A** (GLSKGC(CH2NH)FGLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº: 56) foi feito convertendo o grupo "-C=O" da estrutura principal de $C^6$ para um grupo "-$CH_2$";

[0684] **Análogo B** (GLSKGC(N-Me-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº: 57) foi feito convertendo o grupo "-NH" da estrutura principal de $F^7$ em um grupo "-N-$CH_3$";

[0685] **Análogo E** (GLSKGC(D-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº:136) foi feito usando D-Phe at $F^7$;

[0686] **Análogo F** (GLSKGCF(tBu-Gly)LKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº: 58) foi feito usando uma butila-terciária-Gly em $G^8$;

[0687] **Análogo G** (GLSKGC(3-Cl-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº:137) foi feito adicionando um átomo de cloro a uma posição meta do anel fenila de F7 (variantes similares podem ser geradas fazendo substituições orto, meta e/ou para do anel fenila de Phe7 com Cl, F, Br, OH e/ou $CH_3$); e

[0688] **Análogo H** (GLSKGC[NHCH$_2$CH(Ph)CO]GLKLDRIGSMSGLGC) (SEQ ID Nº: 59) foi feito usando ácido (±)-3-(amino)-2-fenilpropiônico em $F^7$.

[0689] Exemplos de variantes de CNP tendo, por exemplo, extensões de aminoácido, substituições com aminoácidos naturais ou não naturais ou isósteres de ligação a peptídeo, e/ou conjugações a porções de polímero ou hidrofóbicas, incluem, sem limitação:

[0690] Análogo J C6-CH2-NH, N-Me-L9, N-Me-L20 (SEQ ID Nº:

91)

[0691] Análogo K N-Me-L9, N-Me-L20 (SEQ ID Nº: 92)

[0692] Análogo L N-Me-L9, N-Me-L11, N-Me-L20 (SEQ ID Nº: 93)

[0693] Análogo M N-Me-L9, N-Me-L11 (SEQ ID Nº: 94)

[0694] Análogo Z K4R, F7Y (SEQ ID Nº: 95)

[0695] Análogo AA K4R, G8V (SEQ ID Nº: 96)

[0696] Análogo AB K4R, G8S (SEQ ID Nº: 97)

[0697] Análogo AC K4R, G8T (SEQ ID Nº: 98)

[0698] Análogo AD K4R, L9T (SEQ ID Nº: 99)

[0699] Análogo AE K4R, G15R (SEQ ID Nº: 100)

[0700] Análogo AF K4R, G15Cit (SEQ ID Nº: 101)

[0701] Análogo AG K4R, M17V (SEQ ID Nº: 102)

[0702] Análogo AH K4R (SEQ ID Nº: 35)

[0703] Análogo AJ K4R, L20V (SEQ ID Nº: 103)

[0704] Análogo AK K4R, L20t-Bu-Ala (SEQ ID Nº: 104)

[0705] Análogo AT G1E, K4E (SEQ ID Nº: 105)

[0706] Análogo AV G1E, K4E – ácido pentanoico (ligado ao terminal N) (SEQ ID Nº: 106)

[0707] Análogo AW G1E, K4E – ácido heptanoico (ligado ao terminal N) (SEQ ID Nº: 107)

[0708] Análogo AX CNP17 (delta N-term) (SEQ ID Nº: 2)

[0709] Análogo AY GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36)

[0710] Análogo AZ R-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 41)

[0711] Análogo BB G1E – ácido heptanoico (ligado ao terminal N) (SEQ ID Nº: 108)

[0712] Análogo BC G1E – ácido pentanoico (ligado ao terminal N) (SEQ ID Nº: 109)

[0713] Análogo BF K4R, K10Cit (SEQ ID Nº: 110)

[0714] Análogo BG K4R, K10Q (SEQ ID Nº: 111)

[0715] Análogo BH K4R, K10R (SEQ ID Nº: 112)

[0716] Análogo BJ K4R, G15N (SEQ ID Nº: 113)

[0717] Análogo BK K4R, G15S (SEQ ID Nº: 114)

[0718] Análogo BL CNP-37 (SEQ ID Nº: 60) CNP-53 (SEQ ID Nº: 4)

[0719] Análogo CA AAWARLLQEHPNA-CNP22 (SEQ ID Nº: 61)

[0720] Análogo CB AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (SEQ ID Nº: 62)

[0721] Análogo CC DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (SEQ ID Nº: 63)

[0722] Análogo CD SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (caudas de BNP N- e C-terminais) (SEQ ID Nº: 68)

[0723] Análogo CE GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (HSA-CNP22) (SEQ ID Nº: 81)

[0724] Análogo CF GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (SEQ ID Nº: 79)

[0725] PEG(24K)-CNP22

[0726] PEG(20K)-CNP22

[0727] PEG(5K)-CNP22

[0728] PEG(2K)-CNP22

[0729] PEG(2K)-CNP17

[0730] PEG(1K)-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36)

[0731] PEG(1K)-CNP22

[0732] PEO4-(PEO12)3(ramificado)-CNP22

[0733] PEO12-CNP22

[0734] PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36)

[0735] PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36); e

[0736] SEQ ID Nºs:1 a 6 e 34 a 144 e suas variantes que compreendem até cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5 modificações adicionais.

[0737] Em uma modalidade, as variantes de CNP são ciclizadas através da formação de uma ligação dissulfeto entre Cys6 e Cys22. Cys6 pode ser um análogo de cisteína tal como, por exemplo, homocisteína ou penicilamina. Em uma modalidade adicional, as variantes

de CNP podem ser ciclizadas por uma ligação covalente formada cabeça-para-cauda, cadeia lateral-para-cadeia lateral, cadeia lateral-para-cabeça ou cadeia-lateral-para-cauda. Em uma modalidade, a ligação covalente é formada entre um aminoácido no ou em direção ao terminal N e um aminoácido no ou em direção ao terminal C do peptídeo (referido como aminoácidos "terminais" neste contexto). Em outras modalidades, a ligação covalente é formada entre as cadeias laterais dos dois aminoácidos terminais. Em ainda outra modalidade, a ligação covalente é formada entre a cadeia lateral de um aminoácido terminal e o grupo terminal do outro aminoácido terminal ou entre os grupos terminais dos dois aminoácidos terminais.

[0738] Ciclização cabeça-para-cauda do grupo amina terminal para carboxila terminal pode ser realizada usando vários métodos, por exemplo, usando p-nitrofenil éster, 2,4,5-triclorofenil éster, pentafluorfenil éster, o método azida, o método anidrido misto, HATU e cabodimida (por exemplo, DIC, EDC ou DCC) com um catalisador tal como HOBt, HONSu ou HOAt ou ciclização em resina.

[0739] Ainda, a estrutura cíclica pode ser formada através de um grupo de formação de ponte envolvendo as cadeias laterais de resíduos de aminoácido da variante de CNP e/ou resíduos de aminoácido terminais. Um grupo de formação de ponte é uma porção química que permite ciclização de duas porções do peptídeo. Exemplos não limitantes de grupos de formação de ponte incluem amidas, tio éteres, tioésteres, dissulfetos, ureias, carbamatos, sulfonamidas e similar. Uma variedade de métodos é conhecida na técnica para incorporação de unidades tendo tais grupos de formação de ponte. Por exemplo, uma ponte lactama (isto é, uma amida cíclica) pode ser formada entre o grupo amino N-terminal ou um grupo amino em uma cadeia lateral e o ácido carboxílico C-terminal ou um grupo carboxila em uma cadeia lateral, por exemplo, a cadeia lateral de lisina ou ornitina e a cadeia late-

ral de ácido glutâmico ou ácido aspártico. Um tio éster pode ser formado entre o grupo carboxila C-terminal ou um grupo carboxila em uma cadeia lateral e o grupo tiol na cadeia lateral de cisteína ou um análogo de cisteína.

[0740] Alternativamente, uma reticulação pode ser formada através da incorporação de um resíduo lantionina (tiodialanina) para ligar resíduos alanina que são covalentemente ligados juntos por uma ligação tioéter. Em outro método, um agente de reticulação, tal como um ácido dicarboxílico (por exemplo, ácido subérico (ácido octanodioico)), pode ligar os grupos funcionais de cadeias laterais de aminoácido, tais como grupos amino, hidroxila e tiol livres.

[0741] Ciclização catalisada por enzima pode ser também usada. Por exemplo, foi relatado que o domínio tioesterase de tirocidina sintetase pode ser usado para ciclizar um precursor de tioéster, um mutante de subtilisina pode ser utilizado para ciclizar ésteres de fenilalanilamida de peptídeo glicolato e o anticorpo ligase 16G3 pode ser empregado para ciclizar um p-nitrofenilléster. Para uma revisão de ciclização de peptídeo vide Davies*, J. Peptide Sci*., 9: 471-501 (2003), incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

[0742] Em certas modalidades, o produto ciclizado final tem uma pureza de pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99%.

D. Variantes de CNP Quimicamente Modificadas

[0743] Modificação química de CNP22 ou suas variantes pode oferecer potencialmente propriedades vantajosas aos peptídeos de CNP modificados, tais como estabilidade e meia-vida aumentadas e imunogenicidade reduzida (para uma discussão geral de modificação química de proteínas terapêuticas vide *Pharmazie*, 57(1):5-29 (2002)). Por exemplo, ligação de porções naturais ou sintéticas, poliméricas ou não poliméricas (por exemplo, PEG) a peptídeos CNP, para aumentar a

massa total dos peptídeos CNP para as faixas descritas em geral aqui, por exemplo, uma faixa de a partir de cerca de 2,6 ou 2,8 kDa a cerca de 6 ou 7 kDa, pode reduzir a susceptibilidade dos peptídeos modificados à clivagem *in vivo* por exopeptidase e/ou endopeptidase (por exemplo, NEP). Em adição à PEGuilação, glicosilação e outros procedimentos de derivatização químicos, por exemplo, modificação através de fosforilação, amidação, carboxilação, acetilação, metilação e criação de sais de adição ácidos, amidas, ésteres e derivados de N-acila, podem também mascarar potencialmente regiões imunogênicas e/ou regiões proteoliticamente sensíveis (*Science*, 303: 480-482 (2004)).

[0744] Exemplos de modificações químicas incluem, sem limitação, o método de adição de polímero de Bednarsaki e método de reticulação da Altus Corporation para aperfeiçoamento da estabilidade e da resistência à protease e redução de imunogenicidade. Bednarsaki mostrou que adição de polímero pode aperfeiçoar a estabilidade à temperatura da proteína (*Science*, 303: 480-482 (2004)).

[0745] Exemplos de modificações químicas incluem, sem limitação, o método de adição de polímero de Bednarsaki e o método de reticulação da Altus Corporation para aperfeiçoamento da estabilidade e resistência à protease e redução da imunogenicidade. Bednarsaki mostrou que adição de polímero pode aperfeiçoar a estabilidade à temperatura da proteína (*J. Am. Chem. Soc.,* 114(1): 378-380 (1992)) e a Altus Corporation constatou que reticulação com glutaraldeído pode aperfeiçoar a estabilidade da enzima.

[0746] Modificação química de polipeptídeos pode ser formada de uma maneira não específica (levando a misturas de espécies derivatizadas) ou de uma maneira específica de sítio (por exemplo, derivatização direcionada à reatividade de macromolécula do tipo selvagem e/ou modificação seletiva de sítio usando uma combinação de muta-

gênese direcionada a sítio e modificação química) ou, alternativamente, usando métodos de ligação de proteína expressa (*Curr. Opin. Biotechnol*., 13(4): 297-303 (2002)).

Variantes de CNP PEGuiladas

[0747] Em uma modalidade, para estabilidade aumentada (por exemplo, resistência à degradação por NEP), CNP22 ou suas variantes (incluindo aquelas tendo adições, substituições e/ou deleções de aminoácido) são conjugados a polímeros hidrofílicos, naturais ou sintéticos para aumentar a massa total dos peptídeos CNP modificados para uma faixa de a partir de cerca de 2,6 kDa ou 2,8 kDa a cerca de 4, 5, 6, 7 ou mais kDa. Em certas modalidades, os polímeros hidrofílicos adicionados têm uma massa total de cerca de 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 ou cerca de 5 kDa.

[0748] Em uma modalidade, os polímeros hidrofílicos são solúveis em água de maneira que peptídeos CNP conjugados a eles não precipitam em um ambiente aquoso (por exemplo, fisiológico). Ainda, os polímeros hidrofílicos são biocompatíveis, isto é, não causam lesão, toxidez ou uma reação imunológica *in vivo*.

[0749] Os polímeros hidrofílicos podem ser ramificados ou não ramificados. Em uma modalidade, os polímeros hidrofílicos são não ramificados.

[0750] Vários sítios de conjugação de CNP22 ou suas variantes a um polímero hidrofílico são possíveis incluindo, mas não limitado a: (1) apenas no terminal N; (2) apenas no terminal C; (3) apenas no sítio interno (por exemplo, Lys4); (4) em ambos o terminal N e o terminal C; (5) no terminal N e um sítio interno; e (6) no terminal C e um sítio interno. Em uma modalidade, CNP22 ou uma variante do mesmo são conjugados a um polímero hidrofílico apenas no terminal N. Em outra modalidade, conjugação é apenas em um sítio interno (por exemplo,

Lys4). Em ainda outra modalidade, conjugação é no terminal N e um sítio interno (por exemplo, Lys4). Em ainda outra modalidade, para melhor funcionalidade os peptídeos CNP não são conjugados a um polímero hidrofílico em um sítio (por exemplo, Lys10) dentro do domínio cíclico (correspondendo a Cys6 a Cys22 de CNP22). Se conjugação a um polímero hidrofílico for baseada em formação de ligação com um grupo amino primário reativo no peptídeo CNP, conjugação em um sítio interno (por exemplo, Lys4 e/ou Lys10) pode ser prevenida através da substituição de Lys4 e/ou Lys10 com uma aminoácido ou peptidomimético natural ou não natural que não contém um grupo amino primário reativo em uma cadeia lateral tal como, por exemplo, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu ou citrulline (Cit). Em uma modalidade particular, Lys4 e/ou Lys10 são substituídos com Arg. Em outra modalidade, Lys10 não é substituído com Arg.

[0751] Exemplos não limitantes de polímeros hidrofílicos incluem polímeros formados de monômeros carregando ácido carboxílico (por exemplo, ácido metacrílico (MA) e ácido acrílico (AA)), álcoois de polivinila, polímeros formados de monômeros carregando hidroxila (por exemplo, metacrilato de hidroxietila (HEMA), metacrilato de hidroxipropila (HPMA), hidroxipropil metacrilamida e metacrilato de 3-trimetilsililpropila (TMSPMA)), óxidos de polialquileno, polióis polioxietilados (por exemplo, glicerol), poli(etileno glicol) (PEG), poli(propileno glicol), mono-$C_1$-$C_{10}$ alcóxi-PEGs (por exemplo, monometóxi-PEG), tresil monometóxi-PEG, arilóxi-PEGs, acrilato de PEG (PEGA), metacrilato de PEG, propionaldeído de PEG, PEG bis-succinimidil carbonato, copolímeros de 2-metacriloiloxietil-fosforilcolina (MPC) e N-vinil pirrolidona (VP), poli(N-vinil pirrolidona) hidróxi funcional (PVP), SIS-PEG (SIS é copolímero em bloco de poliestireno-poliisobutileno-poliestireno), poliestireno-PEG, poliisobutileno-PEG, PCL-PEG (PCL é policaprolactona), PLA-PEG (PLA ácido poliláctico), PMMA-PEG

(PMMA é poli(metil metacrilato)), PDMS-PEG (PDMS é polidimetiloxanona), PVDF-PEG (PVDF é fluoreto de polivinilideno), tensoativos PLURONIC® (óxido de polipropileno-co-polietileno glicol), poli(tetrametileno glicol), poli(L-lisina-g-etileno glicol) (PLL-g-PEG), poli(L-lisina-g-ácido hialurônico) (PLL-g-HA), poli(L-lisina-g-fosforil colina) (PLL-g-PC), poli(L-lisina-g-vinil pirrolidona) (PLL-g-PVP), poli(etilimina-g-etileno glicol) (PEI-g-PEG), poli(etilimina-g-ácido hialurônico) (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, celulose e seus derivados (por exemplo, hidroxietil celulose), dextrano, dextrinas, ácido hialurônico e seus derivados (por exemplo, hialuronato de sódio), elastina, quitosana, sulfato acrílico, sulfonato acrílico, sulfamato acrílico, sulfato metacrílico, sulfonato metacrílico, sulfamato metacrílico, seus polímeros e copolímeros e polímeros e copolímeros de suas combinações.

[0752] Em uma modalidade particular, o polímero hidrofílico é poli(etileno glicol) (PEG), também chamado poli(etileno óxido) (PEO). Conforme aqui usado, o termo "PEG" ou "PEO" compreende todas as formas de PEG, ramificadas e não ramificadas, que podem ser usadas para derivatizar polipeptídeos incluindo, sem limitação, mono-($C_1$-$C_{10}$)alcóxi-PEGs e ariloxi-PEGs.

[0753] Em uma modalidade, os conjugados de PEG-CNP compreendem um polímero de PEG (ou PEO) da fórmula $(CH_2CH_2O)_n$, onde n é um inteiro de a partir de cerca de 6 a cerca de 100 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,3 kDa a cerca de 5 kDa. Em outra modalidade, n é um inteiro de a partir de cerca de 12 a cerca de 50 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 2,5 kDa. Em ainda outra modalidade, n é de a partir de cerca de 12 a cerca de 24 e o polímero de PEG é de a partir de cerca de 0,6 kDa a cerca de 1,2 kDa. Em uma modalidade adicional, o grupo hidroxila terminal do

polímero de PEG é capeado com um grupo não reativo. Em uma modalidade particular, o grupo de capeamento de extremidade é um grupo alquila, por exemplo, um grupo alquila inferior tal como metila, de maneira que o polímero de PEG termina em um grupo alcóxi. Em uma modalidade, o polímero de PEG não é ramificado. Em outra modalidade, CNP22 ou suas variantes são conjugados a um polímero de PEG apenas no terminal N.

[0754] PEGs e PEOs incluem potencialmente moléculas com uma distribuição de pesos moleculares, isto é, eles são potencialmente polidispersos, dependendo da maneira na qual eles são preparados. O tamanho/distribuição de massa de uma preparação polimérica pode ser caracterizado estatisticamente por seu peso molecular ponderal médio ($M_w$) e seu peso molecular médio numérico ($M_n$), cuja razão é chamada o índice de polidispersidade ($M_n/M_n$). $M_w$ e $M_n$ podem ser medidos através de espectroscopia de massa. Variantes de PEG-CNP conjugadas a uma porção de PEG maior do que 1,5 kDa podem exibir uma faixa de pesos moleculares devido à natureza polidispersa da molécula de PEG de origem. Por exemplo, no caso de mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF Co.), as massas moleculares das moléculas de PEG são distribuídas em uma faixa de a partir de cerca de 1,5 kDa a cerca de 3 kDa, com um índice de polidispersidade de 1,036. Em contraste, os PEGs conjugados a CNP22 ou suas variantes usando reagentes $MS(PEG)_n$ (n=4, 8, 12 ou 24, designado, por exemplo, "PEO12" ou "PEO24") da Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois) são monodispersos, tendo comprimento de cadeia distinto e peso molecular definido.

[0755] Métodos para geração de polipeptídeos compreendendo uma porção de PEG são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Patente U.S. 5.824.784). Métodos para preparação de peptídeos CNP peguilados geralmente compreendem as etapas de (a) reação de CNP22 ou uma variante do mesmo com um reagente de PEGuilação

sob condições adequadas para ligação de PEG ao peptídeo CNP (por exemplo, no terminal N) e (b) obtenção do(s) produto(s) de reação. Devido ao fato da PEGuilação de um peptídeo CNP poder alterar significantemente sua ligação a NPR-B, dependendo do tamanho da porção de PEG e do local de PEGuilação, tipos diferentes de PEG e as condições de reação de PEGuilação podem ser explorados. A química que pode ser usada para PEGuilação de um peptídeo CNP inclui acilação de amina(s) primária(s) reativa(s) do peptídeo usando o NHS-éster de metóxi-PEG (O-[(N-Succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpolietileno glicol). Acilação com metóxi-PEG-NHS ou metóxi-PEG-SPA resulta em uma ligação amida que elimina qualquer carga da amina primária original. PEG-peptídeos CNP designados com o símbolo "PEO12" ou "PEO24", bem como aqueles designados com o símbolo "PEG1K", "PEG2K", "PEG5K" ou "PEG20K", são PEGuilados através da reação de um grupo amino primário no peptídeo com um reagente de PEG capeado na extremidade com metóxi, ativado com éster NHS. PEG-variantes de CNP podem ser também preparados através de outros métodos, por exemplo, através de aminação redutiva envolvendo um grupo amino primário no peptídeo e um PEG aldeído, tal como, por exemplo, PEG-propionaldeído, ou derivados mono-C1-C10 alcóxi ou arilóxi dos mesmos (vide Patente U.S. 5.252.714).

[0756] Diferente da síntese de proteína de ribossomo, síntese de peptídeo sintético acontece do terminal C para o terminal N. Desta maneira, Boc-PEG (contendo *terc*-butiloxicarbonila (Boc)) é um método para ligar PEG ao terminal C de um peptídeo (R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*., 85(14): 2149-2154 (1963)). Alternativamente, química Fmoc (fluorenilmetoxicarbonila) pode ser empregada (E. Atherton e R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, IRL Press (Oxford, Inglaterra (1989))**.**

[0757] Os presentes métodos para preparação de PEG-variantes

de CNP proveem uma mistura substancialmente homogênea de conjugados de polímero-proteína. Após purificação, preparações de PEG-CNP distintas são suficientemente puras para testes *in vitro* e *in vivo* de propriedades biológicas. Conforme aqui demonstrado, certos PEG-variantes de CNP exibem susceptibilidade reduzida à clivagem por NEP e funcionalidade substancialmente similar ou melhor (por exemplo, estimulação de produção de cGMP).

[0758] Conforme aqui descrito, reações de PEGuilação de CNP22 ou suas variantes, usando razões de reagente de PEGuilação/peptídeo CNP e condições de reação apropriadas, proveem derivados de PEG-CNP. A natureza e o grau de PEGuilação podem ser determinados usando, por exemplo, análises PAGE e HPLC. Em certas modalidades, pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 99% de CNP22 ou suas variante são mono-PEGuilados no terminal N. Para otimizar os efeitos benéficos de PEGuilação sobre as propriedades biológicas de um peptídeo CNP, o comprimento do polímero, conformação (por exemplo, ramificada ou linear) e/ou funcionalização (por exemplo, adição de um grupo negativamente carregado) de uma porção de PEG podem ser variados. Variantes de CNP PEGuiladas são testadas quanto à resistência à NEP, farmacocinética ou bioatividade (por exemplo, a habilidade em se ligar a NPR-B e estimular a geração de cGMP). Variantes de CNP PEGuilados que mostram resistência à NEP aperfeiçoada e pelo menos cerca de 50% da atividade de estimulação de cGMP de CNP22 podem ser testadas mais, por exemplo, *in vitro* em um modelo de acondroplasia baseado em célula de condrossarcoma e *in vivo* em um modelo de animal de acondroplasia de murino.

E. Métodos de Uso de Variantes de CNP, Composições Farmacêuticas de Variantes de CNP e Vias de Administração

Métodos de Uso de Variantes de CNP

Distúrbios Relacionados a Osso

[0759] Fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) desempenham papéis importantes em formação de osso e mutações em genes de receptor de FGF (FGFR 1, 2 e 3) dão origem a uma variedade de más formações esqueléticas herdadas (*Curr. Biol*., 5: 500-507 (1995)). Em particular, mutações de ativação em FGFR-3 são responsáveis por distúrbios de ossos longos, incluindo acondroplasia, a forma mais comum de nanismo genético humano (Nature, 371: 252-254 (1994); Cell, 78: 335-342 (1994)), o distúrbio mais leve hipocondroplasia (Ann. N.Y. Acad. Sci., 785: 182-187 (1996)) e a displasia tanatofórica letal mais severa e neonatal (TD) tipos I e II (Hum. Mol. Genet., 5: 509-512 (1996); Nat. Genet., 9: 321-328 (1995)). Modelos de camundongo superexpressando FGF-2, e consequentemente ativando FGFR-3, mostram ossso longos encurtados e macrocefalia (Mol. Biol. Cell., 6: 1861-73 (1995)). Consiste com esse modelo, os camundongos deficientes em FGFR-3 mostram crescimento esquelético notadamente exagerado com placas de crescimento maiores (Nature Genet., 12: 390-397 (1996)).

[0760] Experimentos complementares com CNP, NPR-B e NPR-C sugerem uma ligação entre o ligante de peptídeo, os receptores correspondentes e crescimento de osso. Ativação de NPR-B por concentrações de CNP elevadas no plasma em camundongos transgênicos causa crescimento esquelético excessivo (Nat. Med., 10: 80-86 (2004)) histologicamente similar àquele da cartilagem da placa de crescimento de camundongos inativos em FGFR-3 (Nat. Genet., 4: 390-397 (1996)). Em camundongos inativados em NPR-C, excreção mediada por NPR-C de CNP deve ser eliminada; consistente com este prognóstico, os animais com inativação mostram ossos longos alongados e vértebras alongadas com cifose (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7403-08 (1999)). Por outro lado, camundongos com inativação em CNP são

anões com ossos longos e vértebras mais curtos, um fenótipo histologicamente similar àquele de acondroplasia, e têm mortalidade aumentada como resultado de má oclusão e restrição pulmonar da gaiola de costela pequena (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 4016-4021 (2001)). Consistente com o papel proposto de CNP como um ativador de NPR-B, o camundongo com inativação em NPR-B tem o mesmo fenótipo esquelético com nanismo e mortalidade aumentada que o camundongo inativado em CNP (Proc. Natl. Acad. Sci USA, 101: 17300-05 (2004)). Ainda, em um modelo de camundongo de acondroplasia com FGFR-3 ativo na cartilagem, superexpressão direcionada de CNP em condrócitos age contra nanismo (Yasoda e outros, Nat. Med., 10: 80-86 (2004)). Ainda, CNP foi mostrado desempenhar um papel na regulagem de crescimento de osso endocondral e atividade de condrócito incluindo, mas não limitado a, proliferação e diferenciação de condrócito, inibição do curso de sinalização de proteína cinase ativada por mitógeno (MAP)/MEK (Raf-1) cinase e promoção de ossificação endocondral (Yasoda e outros, Nat. Med., 10: 80-86 (2004)). Esses resultados sugerem que a ativação do sistema CNP/NPR-B é uma estratégia terapêutica potencial para tratamento de acondroplasia humana.

[0761] Através da estimulação de produção de matriz, proliferação e diferenciação de condrócitos e aumento de crescimento do osso longo, as variantes de CNP da invenção são úteis para tratamento de mamíferos, incluindo humanos, sofrendo de um distúrbio relacionado a osso, tal como uma displasia esquelética. Exemplos não limitantes de distúrbios relacionados a osso responsivos a CNP e displasias esqueléticas incluem acondroplasia, hipocondroplasia, estatura baixa, nanismo, osteocondrodisplasias, displasia tanatofórica, osteogênese imperfecta, acondrogênese, condrodisplasia punctata, acondroplasia homozigota, condrodisplasia punctata, displasia camptomélica, hipofosfatasia letal congênita, tipo letal perinatal de osteogênese imperfecta, síndromes de

polidactilia da costela curta, hipocondroplasia, tipo rizomélico de condrodisplasia, displasia metafiseal tipo Jansen, displasia congênita espondiloepifiseal, ateloesteogênese, displasia diastrófica, fêmur curto congênito, displasia mesomélica tipo Langer, displasia mesomélica tipo Nievergelt, síndrome de Robinow, síndrome de Reinhardt, acrodisostose, disostose periférica, displasia Kniest, fibrocondrogênese, síndrome de Robert, displasia acromesomélica, micromelia, síndrome de Morquio, síndrome de Kniest, displasia metatrófica e displasia espondiloepimetafiseal. Ainda, as variantes de CNP são úteis como um adjunto ou alternativa para hormônio do crescimento para tratamento de estatura curta idiopática e outras displasias esqueléticas.

[0762] Ainda, as variantes de CNP são úteis para tratamento de outras condições e distúrbios relacionados a osso tais como raquitismos, raquitismos hipofosfatêmicos [incluindo raquitismos hipofosfatêmicos ligados a X (também chamados raquitismos resistentes à vitamina D) e raquitismo hipofosfatêmicos dominantes autossomais] e osteomalácia [incluindo osteomalácia induzida por tumor (também chamada osteomalácia oncogênica ou osteomalácia hipofosfatêmica oncogênica)].

[0763] As variantes de CNP da invenção podem ser também usadas para tratar osteoartrite. A osteoartrite é uma doença degenerativa da cartilagem articular e ocorre frequentemente em idosos. A osteoartrite envolve destruição da cartilagem e mudança proliferativa no osso e na cartilagem resultante da degeneração de componentes articulares, com a mudança resultando em artrite secundária (por exemplo, sinovite). As proteínas de matriz extracelular, que são a entidade funcional da cartilagem, são reduzidas, e o número de condrócitos diminui em osteoartrite (*Arth. Rheum.* 46(8): 1986-1996 (2002)). Através da promoção da produção de matriz, crescimento e diferenciação de condrócitos, as variantes de CNP são úteis para combater os efeitos inde-

sejados de FGF-2 e aumentar a síntese de matriz em indivíduos sofrendo de artrite, incluindo osteoartrite, desta maneira tratando artrite, incluindo osteoartrite.

Distúrbios do Músculo Liso Vascular

[0764] CNP e outros peptídeos vasoativos (incluindo ANP, BNP e urodilatina) têm propriedades vasodilatadoras e diuréticas e desempenham um papel importante em homeostase vascular (*J. Cardiovasc. Pharmacol*., 117: 1600-06 (1998); *Kidney Int.*, 49: 1732-37 (1996); *Am. J. Physiol*., 275: H1826-1833 (1998)). CNP é amplamente distribuído no sistema cardiovascular, especialmente em concentração alta em células endoteliais vasculares (*J. Cardiovasc. Pharmacol*., 117: 1600-06 (1998)). CNP é um relaxante potente de músculo liso vascular, particularmente na circulação coronária (*Biochem. Biophys. Res. Commun*., 205: 765-771 (1994)), e é um inibidor de proliferação de célula do músculo liso (*Biochem. Biophys. Res. Commun*., 177: 927-931 (1991)). Embora o efeito vasodilatador de CNP seja menos potente do que aquele de ANP (cerca de 1:100) (*Hypertens. Res*., 21: 7–13 (1998); *Am. J. Physiol*., 275: L645–L652 (1998)), mRNA de CNP está aumentado em resposta a estresse por cisalhamento (*FEBS Lett*., 373: 108-110 (1995)) e níveis de CNP no plasma são elevados em patologias cardiovasculares inflamatórias (*Biochem. Biophys. Res. Commun*., 198: 1177-1182 (1994)). CNP foi mostrado suprimir inflamação através de inibição de infiltração de macrófago em artérias da carótida lesionadas de coelhos (*Circ. Res.*, 91: 1063–1069 (2002)) e inibir diretamente proliferação de fibroblasto cardíaco através de um curso dependente de NPR-B/cGMP (*Endocrinology*, 144: 2279–2284 (2003)).

[0765] As ações cardiovasculares de CNP são mediadas através da ativação dos subtipos de NPR, NPR-B e NPR-C (*Endocrinology,* 130: 229-239 (1992)), o último sendo responsável por 95% de NPRs

expressos *in vivo* (*Science*, 293: 1657-1662 (2001)). Os cursos de CNP/NPR-B levam à elevação de cGMP, um mensageiro *sec*undário bem estabelecido no sistema cardiovascular. A porção de 37 aminoácidos de NPR-C's do terminal C tem uma sequência de consenso que interage com a proteína G heterodimérica $G_i$ (*J. Biol. Chem*., 274: 17587-17592 (1999)), que foi mostrada regular a atividade de adenilato ciclase e fosfolipase C (*J. Biol. Chem*., 276: 22064-70 (2001); *Am. J. Physiol*., 278: G974-980 (2000); *J. Biol. Chem*., 271: 19324-19329 (1996)). CNP faz a mediação de hiperpolarização de músculo liso e relaxamento através da ativação de NPR-C e a abertura de canal $K^+$ de retificação para dentro, regulado pela proteína G (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1426-1431 (2003)). CNP tem efeitos antiproliferativos importantes em fibroblastos cardíacos e, através de interação com NPR-C, regula fluxo de sangue local e pressão sanguínea sistêmica através de células do músculo liso de hiperpolarização (R. Rose e W. Giles, *J. Physiol.* 586: 353-366 (2008)).

[0766] Ao se ligar a NPR-B em células do músculo liso vascular, CNP22 estimula a produção de cGMP, que age como um mensageiro *sec*undário intracelular para causar por fim o relaxamento dos vasos sanguíneos. Com base nas ações hipotensivas de CNP, as variantes de CNP da invenção são úteis para tratamento de hipertensão, falência cardíaca congestiva, edema cardíaco, nefredema, edema hepático, insuficiências renais aguda e crônica e outros. Ainda, ativação de sinalização de cGMP suprime o crescimento de células do músculo liso vascular. Desta maneira, as variantes de CNP da invenção podem ser usadas para tratar condições ou doenças causadas pelo crescimento anormal de células do músculo liso vascular incluindo, mas não limitado a, restenose e aterosclerose.

[0767] Os estudos descritos acima sugerem que CNP pode ser um candidato terapêutico potencial para relaxamento do músculo liso vas-

cular e remodelagem. Efeitos farmacológicos de CNP com relação a certos distúrbios foram atribuídos, em parte, a efeitos vasoprotetores ao invés da atividade vasodilatadora (*Am. J. Respir. Crit. Care Med*., 170: 1204-1211 (2004)). Desta maneira, as variantes de CNP da presente invenção são úteis para tratamento de condições, por exemplo, distúrbios do músculo liso vascular, onde CNP pode ter um efeito vasoprotetor incluindo, sem limitação, indução do relaxamento do músculo liso e inibição de infiltração de macrófagos em tecido cardíaco. Em uma modalidade, as variantes de CNP são usadas para tratar falência cardíaca incluindo, mas não limitado a, falência cardíaca descompensada aguda e falência cardíaca congestiva aguda. Em outra modalidade, as variantes de CNP são usadas para tratar asma, cardiomiopatia e restenose de artérias coronárias (através do aumento do relaxamento de célula do músculo liso e diminuição da proliferação de células do músculo liso).

Composições Farmacêuticas de Variantes de CNP

[0768] Em modalidades adicionais, a invenção provê composições farmacêuticas compreendendo uma variante de CNP e um ou mais excipientes, carreadores e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis. Em certas modalidades, as composições compreendem ainda um ou mais outros agentes biologicamente ativos (por exemplo, inibidores de protease, receptor da tirosina cinase e/ou o receptor de excreção NPR-C).

[0769] Em algumas modalidades, as composições compreendem a variante de CNP desejada em pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de pureza. Em certas modalidades, as composições contêm menos do que cerca de 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou 0,5% de contaminantes macromoleculares, tais como outras proteínas de mamífero (por exemplo, humanos) e outras variantes de CNP.

[0770] Exemplos não limitantes de excipientes, carreadores e diluentes incluem veículos, líquidos, tampões, agentes de isotonicidade, aditivos, estabilizadores, conservantes, solubilizadores, tensoativos, emulsificantes, agentes umectantes, adjuvantes e outros. As composições podem conter líquidos (por exemplo, água, etanol); diluentes de vários teor de tampão (por exemplo, Tris-HCl, fosfato, tampões de acetato, tampões de citrato), pH e resistência iônica; detergentes e agentes de solubilização (por exemplo, Polissorbato 20, Polissorbato 80), antioxidantes (por exemplo, metionina, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio); conservantes (por exemplo, Thimerosol, álcool benzílico, m-cresol); e substâncias de volume (por exemplo, lactose, manitol, sacarose). O uso de excipientes, diluentes e carreadores na formulação de composições farmacêuticas é conhecido na técnica; vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a Edição, páginas 1435-1712, Mack Publishing Co. (Easton, Pennsilvânia (1990)), que é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0771] Por exemplo, carreadores incluem, sem limitação, diluentes, veículos e adjuvantes, bem como carreadores de implante, e cargas inertes, sólidas ou líquidas não tóxicas e materiais de encapsulação que não reagem com o(s) ingrediente(s) ativo(s). Exemplos não limitantes de carreadores incluem solução salina tamponada com fosfato, solução salina fisiológica, água e emulsões (por exemplo, emulsões óleo/água). Um carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol líquido e similar), um óleo vegetal e misturas dos mesmos.

[0772] Em algumas modalidades, as composições são formulações líquidas. Em certas modalidades, as formulações compreendem uma variante de CNP em uma faixa de concentração de a partir de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 20 mg/ml ou de a partir de cerca de 0,5

mg/ml a cerca de 20 mg/ml ou de  a partir de cerca de 1 ml/ml a cerca de 20 mg/ml ou de a partir de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 10 mg/ml ou de a partir de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 10 mg/ml ou de a partir de cerca de 1 mg/ml a cerca de 10 mg/ml.

[0773] Em modalidades adicionais, as composições compreendem uma solução tampão ou agente de tamponamento para manter o pH de uma solução ou suspensão contendo CNP dentro de uma faixa desejada. Exemplos não limitantes de soluções tampão incluem solução salina tamponada com fosfato, solução salina tamponada com Tris e solução salina tamponada de Hank. Agentes de tamponamento incluem, sem limitação, acetato de sódio, fosfato de sódio e citrato de sódio. Misturas de agentes de tamponamento podem também ser usadas. Em certas modalidades, o agente de tamponamento é ácido acético/acetato ou ácido cítrico/citrato. A quantidade de agente de tamponamento adequada em uma composição depende em parte do tampão particular usado e do pH desejado da solução ou suspensão. Por exemplo, acetato é um tampão de pH mais eficiente em pH 5 do que pH 6, então menos acetato pode ser usado em uma solução em pH 5 do que em pH 6. Em algumas modalidades, o agente de tamponamento tem uma concentração de cerca de 10 mM ± 5 mM. Em certas modalidades, o pH de uma composição é de a partir de cerca de pH 3 a cerca de pH 7,5 ou de a partir de cerca de pH 3,5 a cerca de pH 7 ou de a partir de cerca de pH 3,5 a cerca de pH 6,5 ou de a partir de cerca de pH 4 a cerca de pH 6 ou de a partir de cerca de pH 4 a cerca de pH 5 ou é em cerca de pH 5,0 ± 1,0.

[0774] Em outras modalidades, as composições contêm um agente de ajuste de tonicidade para tornar a solução ou suspensão isotônica e mais compatível para injeção. Exemplos não limitantes de agentes de isotonicidade incluem NaCl, dextrose, glicose, glicerina, sorbitol, xilitol e etanol. Em certas modalidades, o agente de isotonicidade é

NaCl. Em certas modalidades, NaCl está em uma concentração de cerca de 160 ± 20 mM ou cerca de 140 mM ± 20 mM ou cerca de 120 ± 20 mM ou cerca de 100 mM ± 20 mM ou cerca de 80 mM ± 20 mM ou cerca de 60 mM ± 20 mM.

[0775] Em outras modalidades, as composições compreendem um conservante. Conservantes incluem, mas não estão limitados a, m-cresol e álcool benzílico. Em certas modalidades, o conservante está em uma concentração de cerca de 0,4% ± 0,2%, ou cerca de 1% ± 0,5%, ou cerca de 1,5% ± 0,5%, ou cerca de 2,0% ± 0,5%.

[0776] Ainda em outras modalidades, as composições contêm um antiadsorvente (por exemplo, para mitigar a adsorção de uma variante de CNP a vidro ou plástico). Antiadsorventes incluem, sem limitação, álcool benzílico, Polissorbato 20 e Polissorbato 80. Em certas modalidades, o antiadsorvente está em uma concentração de a partir de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% ou de a partir de cerca de 0,01% a cerca de 0,5% ou de a partir de cerca de 0,1% a cerca de 1% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 1% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 1,5% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 2% ou de a partir de cerca de 1% a cerca de 2%.

[0777] Em modalidades adicionais, as composições compreendem um estabilizador. Exemplos não limitantes de estabilizadores incluem glicerina, tioglicerol, metionina e ácido ascórbico e seus sais. Em algumas modalidades, quando o estabilizador é tioglicerol ou ácido ascórbico ou um sal do mesmo, o estabilizador está em uma concentração de a partir de cerca de 0,1% a cerca de 1%. Em outras modalidades, quando o estabilizador é metionina, o estabilizador está em uma concentração de a partir de cerca de 0,01% a cerca de 0,5% ou de a partir de cerca de 0,01% a cerca de 0,2%. Em outras modalidades, quando o estabilizador é glicerina, o estabilizador está em uma concentração de a partir de cerca de 5% a cerca de 100% (líquido).

[0778] Em modalidades adicionais, as composições contêm um antioxidante. Antioxidantes exemplares incluem, sem limitação, metionina e ácido ascórbico. Em certas modalidades, a razão molar de antioxidante para variante de CNP é de a partir de cerca de 0,1:1 a cerca de 15:1 ou de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 15:1 ou de a partir de cerca de 0,5:1 a cerca de 10:1 ou de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 10:1 ou de a partir de cerca de 3:1 a cerca de 10:1.

[0779] Sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados nas composições incluindo, sem limitação, sais de ácido mineral (por exemplo, cloridrato, bromidrato, fosfato, sulfato), sais de ácidos orgânicos (por exemplo, acetato, propionato, malonato, benzoato, mesilato, tosilato) e sais de aminas (por exemplo, isopropilamina, trimetilamina, diciclohexilamina, dietanolamina). Uma discussão na íntegra de sais farmaceuticamente aceitáveis é encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edição, Mack Publishing Company, (Easton, Pensilvânia (1990)).

[0780] As composições farmacêuticas podem ser administradas em várias formas, tais como comprimidos, cápsulas, grânulos, pós, soluções, suspensões, emulsões, unguentos e emplastros transdermais. As formas de dosagem das composições podem ser formuladas especificamente para o modo de administração desejado das composições. Para administração oral, as composições podem tomar a forma de, por exemplo, um comprimido ou cápsula (incluindo cápsula de gel macia) ou podem ser, por exemplo, uma solução, suspensão ou xarope aquoso ou não aquoso. Comprimidos e cápsulas para administração oral podem incluir um ou mais excipientes, diluentes e carreadores geralmente usados tais como manitol, lactose, glicose, sacarose, amido, amido de milho, sacarina de sódio, talco, celulose, carbonato de magnésio e agentes lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, estearil fumarato de sódio). Se desejado, agentes de coloração

e/ou adoçantes podem ser adicionados às formulações sólidas e líquidas. Outros ingredientes opcionais para formulações orais incluem, sem limitação, conservantes, agentes de suspensão e agentes de espessamento. Formulações orais podem também ter um revestimento entérico para proteger a variante de CNP do ambiente ácido do estômago. Métodos de preparação de formas de dosagem sólidas e líquidas são conhecidos, ou ficarão aparentes, daqueles versados na técnica (vide, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, referido acima).

[0781] Formulações para administração parenteral podem ser preparadas, por exemplo, como soluções ou suspensões líquidas, como formas sólidas para solubilização ou suspensão em um meio líquido antes da injeção ou como emulsões. Por exemplo, soluções e suspensões injetáveis estéreis podem ser formuladas de acordo com técnicas conhecidas no campo usando diluentes, carreadores, solventes (por exemplo, solução aquosa tamponada, solução de Ringer, solução de cloreto de sódio isotônica), agentes de dispersão, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes de suspensão e similar. Ainda, óleos fixos estéreis, ésteres graxos, polióis e/ou outros ingredientes inativos podem ser usados. Como exemplos adicionais, formulações para administração parenteral incluem soluções injetáveis estéreis aquosas, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do recipiente pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas, que podem conter agentes de suspensão e agentes de espessamento.

[0782] Composições compreendendo uma variante de CNP podem ser também formulações liofilizadas. Em certas modalidades, as formulações liofilizadas compreendem um tampão ou agente de volume e opcionalmente um antioxidante. Tampões exemplares incluem, sem limitação, tampões de acetato e tampões de citrato. Agentes de

volume adequados incluem, sem limitação, manitol, sacarose, dextrano, lactose, trealose e povidona (PVP K24). Em certas modalidades, manitol está em uma quantidade de a partir de cerca de 3% a cerca de 10% ou de a partir de cerca de 4% a cerca de 8% ou de a partir de cerca de 4% a cerca de 6%. Em certas modalidades, a sacarose está em uma quantidade de a partir de cerca de 6% a cerca de 20% ou de a partir de cerca de 6% a cerca de 15% ou de a partir de cerca de 8% a cerca de 12%. Antioxidantes exemplares incluem, mas não estão limitados a, metionina e ácido ascórbico.

[0783] A invenção também provê estojos contendo, por exemplo, garrafas, frascos, ampolas, tubos, cartuchos e/ou seringas que compreendem uma formulação líquida (por exemplo, injetável estéril) ou uma formulação sólida (por exemplo, liofilizada). Os estojos podem também conter veículos ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis (por exemplo, solventes, soluções e/ou tampões) para reconstituição de uma formulação sólida (por exemplo, liofilizada) em uma solução ou suspensão para administração (por exemplo, através de injeção) incluindo, sem limitação, reconstituição de uma formulação liofilizada em uma seringa para injeção ou para diluição de concentrado para uma concentração menor. Ainda, soluções e suspensões de injeção extemporâneas podem ser preparadas a partir de, por exemplo, pós estéreis, grânulos ou comprimidos compreendendo uma composição contendo CNP. Os estojos podem também incluir dispositivos de aplicação, tais como dispositivos de aplicação aerossol ou injeção, injetores de caneta, autoinjetores, injetores sem agulha, seringas e/ou agulhas.

[0784] Como um exemplo não limitante, um estojo pode incluir seringas tendo uma câmara única ou câmaras duplas. Para seringa de câmara única, a câmara única pode conter uma formulação de CNP líquida pronta para injeção ou uma formulação de CNP sólida (por exemplo, liofilizada) ou uma formulação líquida de uma variante de

CNP em uma quantidade relativamente pequena de um sistema de solvente adequado (por exemplo, glicerina) que pode ser reconstituído em uma solução ou suspensão para injeção. Para seringas de câmara dupla, uma câmara pode conter um veículo ou carreador farmaceuticamente aceitável (por exemplo, sistema solvente, solução ou tampão) e a outra câmara pode conter uma formulação de CNP sólida (por exemplo, liofilizada) ou uma formulação líquida de uma variante de CNP em uma quantidade relativamente pequena de um sistema solvente adequado (por exemplo, glicerina) que pode ser reconstituído em uma solução ou suspensão, usando o veículo ou carreador da primeira câmara, para injeção.

[0785] Como um exemplo adicional, um estojo pode incluir um ou mais dispositivos injetor de caneta ou autoinjetor e cartuchos de câmara dupla. Uma câmara de um cartucho pode conter um veículo ou carreador farmaceuticamente aceitável (por exemplo, sistema solvente, solução ou tampão) e a outra câmara pode conter uma formulação de CNP sólida (por exemplo, liofilizada) ou uma formulação líquida de uma variante de CNP em uma quantidade relativamente pequena de um sistema solvente adequado (por exemplo, glicerina) que pode ser reconstituído em uma solução ou suspensão, usando o veículo ou carreador da primeira câmara, para injeção. Um cartucho pode compreender uma quantidade da variante de CNP que é suficiente para dosagem durante um período de tempo desejado (por exemplo, 1 dia, 2 dias, 3 dias, uma semana, duas semanas, 3 semanas, 4 semanas, etc). O injetor em caneta ou autoinjetor pode ser ajustado para administrar uma quantidade desejada da formulação de CNP de um cartucho.

[0786] Ainda, composições farmacêuticas compreendendo uma variante de CNP podem ser formuladas como um sistema de liberação lenta, liberação controlada ou liberação sustentada para manutenção de um nível de dosagem relativamente constante durante um período

de tempo desejado, tal como uma semana, duas semanas, 3 semanas, 1 mês, 2 meses ou 3 meses. Formulações de liberação lenta, liberação controlada e liberação sustentada podem ser preparadas usando, por exemplo, sistemas poliméricos biodegradáveis {que podem compreender, por exemplo, polímeros hidrofílicos [polilactídeo, poliglicolídeo, poli(lactídeo-glicolídeo)]} e podem tomar a forma de, por exemplo, micropartículas, microesferas ou lipossomas, como é conhecido na técnica.

Dosagens e Frequência de Dosagem

[0787] Conforme aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" de um agente ativo (por exemplo, uma variante de CNP) refere-se a uma quantidade que provê benefício terapêutico a um paciente. A quantidade pode variar de um indivíduo para outro e pode depender de vários fatores, incluindo a condição física geral do paciente. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante de CNP pode ser prontamente definida por um versado na técnica, usando materiais e procedimentos publicamente disponíveis. Por exemplo, a quantidade de uma variante de CNP usada para terapia deve dar uma taxa aceitável de crescimento com base em gráficos de crescimento para crianças em idades de 0-17 anos com acondroplasia (214 fêmeas e 189 machos), que listam altura para idade, circunferência da cabeça e crescimento segmental (Horton, W.A. e outros, *Standard growth curves for achondroplasia, J. Pediatr*., 93: 435-8 (1978)). Gráficos de CDC podem ser usados para avaliar o peso para idade e o peso para altura ou BMI para idade. Resultados *sec*undários com cursos que são mais crônicos em natureza podem ser também medidos.

[0788] Tendo uma meia-vida no soro mais longa do que CNP22 do tipo selvagem, as variantes de CNP podem potencialmente ser administrados menos frequentemente do que CNP22. A frequência de dosagem para um indivíduo particular pode variar dependendo de vários

fatores, incluindo o distúrbio sendo tratado e a condição e a resposta do indivíduo à terapia. Em certas modalidades, uma composição farmacêutica contendo uma variante de CNP é administrada a um indivíduo cerca de uma vez por dia, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias ou uma vez por semana. Em uma modalidade, para tratamento de distúrbios relacionados a osso (por exemplo, displasia esquelética, incluindo acondroplasia), uma dosagem diária ou semanalmente de uma variante de CNP é administrada a pacientes até e/ou durante a idade adulta.

[0789] As variantes de CNP descritas aqui podem ser administradas a pacientes em doses terapeuticamente eficazes para tratar, melhorar ou prevenir distúrbios relacionados a osso (por exemplo, displasias esqueléticas, incluindo acondroplasia) e condições (por exemplo, distúrbios do músculo liso vascular) onde CNP pode prover um efeito vasoprotetor. A segurança e a eficácia terapêutica das variantes de CNP podem ser determinadas através de procedimentos farmacológicos padrão em culturas de célula ou animais experimentais tais como, por exemplo, através da determinação da $LD_{50}$ (a dose letal para 50% da população) e da $ED_{50}$ (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a razão $LD_{50}/ED_{50}$. Agentes ativos que exibem um índice terapêutico alto são normalmente preferidos.

[0790] Dados obtidos de ensaios de cultura de célula e estudos animais podem ser usados para formular uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem normalmente se encontra dentro de uma faixa de concentrações de circulação que incluem a $ED_{50}$, com pouca ou mínima toxidez. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. A dose terapeuticamente eficaz pode ser determinada a

partir de ensaios de cultura de célula e estudos animais.

[0791] Em certas modalidades, as variantes de CNP descritas aqui são administradas em uma dose na faixa de a partir de cerca de 5 ou 10 nmo/kg a cerca de 300 nmol/kg ou de a partir de cerca de 20 nmol/kg a cerca de 200 nmol/kg. Em algumas modalidades, as variantes de CNP são administradas em uma dose de cerca de 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 ou 2000 nmol/kg ou outra dose considerada apropriada pelo médico responsável pelo tratamento. Em outras modalidades, as variantes de CNP são administradas em uma dose de cerca de 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 ou 1000 ug/kg ou cerca de 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ou 10 mg/kg ou outra dose considerada apropriada pelo médico responsável pelo tratamento. As doses de variantes de CNP descritas aqui podem ser administradas de acordo com a frequência de dosagem/frequência de administração descritas aqui, incluindo, sem limitação, diariamente, duas ou 3 vezes por semana, semanalmente, a cada duas semanas, a cada 3 semanas, mensalmente, etc.

[0792] A frequência de dosagem/administração de uma variante de CNP para um indivíduo particular pode variar dependendo de vários fatores incluindo o distúrbio sendo tratado e a condição e resposta do indivíduo à terapia. A variante de CNP pode ser administrada em uma dose única ou em doses múltiplas por dosagem. Em certas modalidades, a variante de CNP é administrada, em uma dose única ou doses múltiplas, diariamente, dia-sim-dia-não, a cada 3 dias, duas vezes por semana, 3 vezes por semana, semanalmente, bi-semanalmente, a ca-

da 3 semanas, mensalmente, a cada 6 semanas, a cada 2 meses, a cada 3 meses ou conforme considerado apropriado pelo médio responsável pelo tratamento.

[0793] Em algumas modalidades, uma variante de CNP é administrada de maneira a permitir períodos de crescimento (por exemplo, condrogênese), seguido por um período de recuperação (por exemplo, osteogênese). Por exemplo, a variante de CNP pode ser administrada intravenosamente, subcutaneamente ou através de outro modo diariamente ou várias vezes por semana por um período de tempo, seguido por um período sem tratamento, então o ciclo é repetido. Em algumas modalidades, o período de tratamento inicial (por exemplo, administração da variante de CNP diariamente ou múltiplas vezes por semana) é por 3 dias, uma semana, duas semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas ou 12 semanas. Em uma modalidade relacionada, o período sem tratamento dura 3 dias, uma semana, duas semanas, 3 semanas ou 4 semanas. Em certas modalidades, o regime de dosagem da variante de CNP é diariamente por 3 dias seguido por 3 dias de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por uma semana seguido por 3 dias ou duas semanas de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por duas semanas seguido por uma ou duas semanas de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por 3 semanas seguido por uma, duas ou 3 semanas de descanso; ou diariamente ou múltiplas vezes por semana por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 semanas seguido por 1, 2, 3 ou 4 semanas de descanso.

Modos de Administração

[0794] As variantes de CNP, ou composições farmacêuticas contendo as mesmas, podem ser administradas a indivíduos de várias maneiras tais como, por exemplo, através de injeção subcutaneamen-

te, intravenosamente, intra-arterialmente, intraperitonealmente, intramuscularmene, intradermalmente ou intratecalmente. Em uma modalidade, as variantes de CNP são administradas através de uma injeção subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, intradermal ou intratecal única uma vez por dia.

[0795] As variantes de CNP pode ser administradas através de injeção direta no ou próximo do sítio de doença. Ainda, as variantes de CNP podem ser administradas através de implante de um depósito no sítio de ação alvo (por exemplo, um osso anormal ou displástico). Alternativamente, as variantes de CNP podem ser administradas sublingualmente sob a língua (por exemplo, comprimido sublingual) ou através de inalação nos pulmões (por exemplo, inalador ou *spray* nasal), através de aplicação na cavidade nasal (por exemplo, pulverização intranasal), através de aplicação ao olho (por exemplo, colírio) ou através de aplicação transdermal (por exemplo, por meio de um emplastro na pele). As variantes de CNP podem ser também administradas oralmente na forma de microesfera, microcápsulas, lipossomas (não carregados ou carregados (por exemplo, catiônicos)), micropartículas poliméricas (por exemplo, poliamidas, polilactídeo, poliglicolídeo, poli(lactídeo-glicolídeo)), microemulsões e similar.

[0796] Um método adicional de administração é através de bomba osmótica (por exemplo, uma bomba Alzet) ou minibomba (por exemplo, uma minibomba osmótica Alzet), que permite aplicação controlada, contínua e/ou de liberação lenta da variante de CNP ou composição farmacêutica durante um período predeterminado. A bomba ou minibomba osmótica pode ser implantada subcutaneamente ou próximo do sítio alvo (por exemplo, os ossos longos de membros, as epífises, etc).

[0797] Conforme acima explicado, as variantes de CNP podem ser usadas para tratar condições ou doenças causadas pelo crescimento

anormal de células de músculo liso vascular incluindo, mas não limitado a, restenose e arteriosclerose. Para aplicação local de uma variante de CNP ao recipiente corporal doente (por exemplo, vaso sanguíneo), a variante de CNP pode ser aplicada por meio de um dispositivo médico (por exemplo, um *stent*) implantado no sítio doente. Em uma modalidade, a variante de CNP é impregnada em uma matriz polimérica ou revestimento polimérico disposto em um *stent.* Em outra modalidade, a variante de CNP está contida em reservatórios ou canais formados no corpo de um *stent* e cobertos por uma membrana ou camada polimérica porosa através da qual a variante de CNP pode difundir. A matriz polimérica, revestimento, membrana ou camada pode compreender pelo menos um polímero biodegradável (por exemplo, hidrofílico), como é conhecido na técnica. Em uma modalidade adicional, a variante de CNP pode estar contida em microporos no corpo de um *stent*. A variante de CNP pode ser aplicada a partir de um *stent* através de liberação em explosão, liberação em pulso, liberação controlada ou liberação sustentada ou uma combinação das mesmas. Por exemplo, o *stent* de aplicar localmente a variante de CNP ao sítio doente em uma liberação por explosão seguido por uma liberação sustentada. Liberação sustentada pode ser durante um período de até cerca de duas semanas, 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses ou 1 ano.

[0798] Será aparente a um versado na técnica que as variantes de CNP ou suas composições podem ser também administradas através de outros modos. Determinação do modo de administração mais eficaz das variantes de CNP ou suas composições está dentro da habilidade do versado na técnica.

[0799] As variantes de CNP pode ser administradas como formulações farmacêuticas adequadas para, por exemplo, administração oral (incluindo bucal e sublingual), retal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal ou parental (incluindo intramuscular, intra-arterial, intratecal, subcu-

tânea e intravenosa) ou em uma forma adequada para administração através de inalação ou insuflação. Dependendo do modo de administração pretendido, as formulações farmacêuticas podem estar na forma de formas de dosagem sólida, semi-sólida ou líquida, tais como comprimidos, supositórios, pílulas, cápsulas, pós, líquidos, suspensões, emulsões, cremes, unguentos, loções e similar. As formulações podem ser providas em forma de dosagem unitária adequada para administração única de uma dosagem precisa. As formulações compreendem uma quantidade eficaz de uma variante de CNP e um ou mais excipientes, carreadores e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis e opcionalmente um ou mais agentes biologicamente ativos.

Terapia de Combinação

[0800] Em uma modalidade, uma variante de CNP pode ser usada em combinação com um ou mais outros agentes ativos úteis para tratamento, melhora ou prevenção de condições ou distúrbios responsivos a CNP tais como, por exemplo, distúrbios relacionados a osso (por exemplo, displasias esqueléticas) e distúrbios de músculo liso vascular. O(s) agente(s) ativo(s) pode(m) aumentar os efeitos da variante de CNP e/ou exercer outros efeitos farmacológicos em adição àqueles da variante de CNP. Exemplos não limitantes de agentes ativos que podem ser usados em combinação com as variantes de CNP descritas aqui são outros peptídeos natriuréticos (por exemplo, BNP) e inibidores (por exemplo, antagonistas) de peptidases e proteases (por exemplo, NEP e furina), NPR-C e tirosina cinase (por exemplo, FGFR-3). Através da prevenção da clivagem por NEP da variante de CNP, um inibidor de NEP pode prolongar a meia-vida da variante. Exemplos de inibidores de NEP incluem, sem limitação, tiorfano e candoxatril. Co-uso de um inibidor de NPR-C pode também prolongar a meia-vida da variante de CNP através da inibição da excreção da variante por NPR-C. Um exemplo não limitante de um inibidor de NPR-C é o fragmento

FGIPMDRIGRNPR (SEQ ID Nº: 82), que seria liberado no sítio alvo (por exemplo, placa de crescimento ósseo) quando da clivagem proteolítica da quimera FGIPMDRIGRNPR-CNP22 (CZ Análogo) (SEQ ID Nº: 82) ou quimeras similares compreendendo variantes de CNP22 (por exemplo, aquelas contendo substituição(ões), adição(ões) e/ou deleção(ões) de aminoácido com relação a CNP22). Co-uso de um inibidor de tirosina cinase pode acentuar os efeitos de uma terapia com CNP através de inibição do receptor tirosina cinase FGFR-3, um regulador negativo de condrócito e formação de osso. Exemplos não limitantes de inibidores de tirosina cinase incluem aqueles revelados na U.S. 6.329.375 e 6.344.459.

[0801] Para obter o resultado terapêutico apropriado nas terapias de combinação, uma pessoa geralmente administraria ao indivíduo a composição de CNP e/ou outro(s) agente(s) terapêutico(s) em uma quantidade combinada eficaz para produzir o resultado terapêutico desejado (por exemplo, crescimento ósseo restaurado). Este processo pode envolver administração da composição de CNP e outro(s) agente(s) terapêutico(s) ao mesmo tempo. Administração simultânea pode ser obtida através da administração de uma composição simples ou formulação de proteína farmacológica que inclui ambos a variante de CNP e outro(s) agente(s) terapêutico(s). Alternativamente, o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) pode(m) ser tomados separadamente mais ou menos ao mesmo tempo que uma formulação farmacológica (por exemplo, comprimido, injeção ou bebida) da variante de CNP. A variante de CNP pode ser também formulada em um alimento tais como *brownies,* panquecas, ou torta adequados para ingestão.

[0802] Em outras alternativas, administração da variante de CNP pode preceder ou seguir administração do(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) através de intervalos variando de minutos a horas. Em modalidades onde o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) e a composição

de CNP são administrados separadamente, uma pessoa geralmente asseguraria que a variante de CNP e o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) fossem administrados dentro de um tempo apropriado um do outro de maneira que ambos a variante de CNP e o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s) possam exercer, sinergisticamente ou aditivamente, um efeito benéfico no paciente. Por exemplo, uma pessoa pode administrar a composição de CNP dentro de cerca de 0,5-6 horas (antes ou após) o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s). Em uma modalidade, a composição de CNP é administrada dentro de cerca de uma hora (antes ou após) o(s) outro(s) agente(s) terapêutico(s).

Identificação e Monitoramento de Populações de Paciente

[0803] Podem ser estabelecidos protocolos para identificar indivíduos adequados para terapia com CNP e determinar se um dado paciente é responsivo à terapia com CNP. Por exemplo, para tratamento de distúrbios relacionados com osso, indicadores de crescimento pode ser medidos, tais como medições de crescimento de osso longo *in utero* e neonatal e medições de biomarcadores de crescimento de osso tais como CNP, cGMP, Colágeno II, osteocalcina e Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação (PCNA).

[0804] Um marcador de sinalização de CNP é cGMP (monofosfato de guanosina 3',5' cíclico). O nível desta molécula de sinalização intracelular aumenta após CNP se ligar a e ativar seu receptor cognato NPR-B. Níveis elevados de cGMP podem ser medidos de extratos de cultura celular (*in vitro*) após exposição a CNP, meios condicionados de estudo de explante de osso (*ex vivo*) após exposição a CNP e no plasma (*in vivo*) dentro de minutos de administração de CNP subcutaneamente, intravenosamente ou através de outras vias de administração conhecidas na técnica.

[0805] Analitos específicos de cartilagem e osso (ou marcadores associados à cartilagem e osso) podem ser também medidos para

avaliar a eficácia de CNP. Por exemplo, fragmentos de colágeno tipo II clivado são um marcador específico para cartilagem para mudança de cartilagem. Colágeno tipo II é o principal constituinte orgânico de cartilagem e fragmentos de colágeno tipo II (colágeno clivado) são liberados na circulação, e subsequentemente *sec*retados na urina, seguindo mudança de cartilagem. Mudança de cartilagem precede formação de osso novo.

[0806] Um biomarcador específico de osso para formação de osso que pode ser medido são peptídeos N-terminais de pró-colágeno tipo I (PINP). A síntese de colágeno tipo I é uma etapa importante em formação de osso, uma vez que colágeno tipo I é o componente orgânico principal em matriz de osso. Durante a síntese de colágeno, os peptídeos são liberados da molécula de pró-colágeno e podem ser detectados no soro. Ainda, fragmentos de colágeno tipo I podem ser medidos como um marcador para reabsorção óssea.

[0807] Outros biomarcadores potenciais para formação e crescimento de cartilagem e osso incluem sulfato de condroitina agrecano (marcador específico para cartilagem para mudança de cartilagem), pró-peptídeos de colágeno tipo II (marcador específico para cartilagem para formação de cartilagem), fosfatase alcalina (específica de osso) e osteocalcina (marcador específico de osso para formação de osso). Biomarcadores associados à cartilagem e osso podem ser medidos, por exemplo, em soro de estudos *in vivo* de eficácia/farmacodinâmica e do meio condicionado de estudos *ex vivo*, usando estojos comercialmente disponíveis.

[0808] Em uma modalidade, o nível de pelo menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem é ensaiado ou medido em um indivíduo que foi administrado com uma variante de CNP a fim de monitorar os efeitos da variante de CNP sobre formação e crescimento de osso e cartilagem *in vivo*. Por exemplo, um aumento no nível de pelo

menos um biomarcador associado a osso ou cartilagem pode indicar que administração de uma variante de CNP pode ter um efeito positivo sobre crescimento de osso e é um tratamento útil para displasias esqueléticas e outras doenças ou distúrbios relacionados a osso ou cartilagem associados com atividade de CNP menor. Biomarcadores associados a osso ou cartilagem exemplares incluem, mas não estão limitados a, CNP (por exemplo, níveis endógenos de CNP), cGMP, pró-peptídeos de colágeno tipo II e seus fragmentos, colágeno tipo II e seus fragmentos, osteocalcina, antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), pró-peptídeos de pró-colágeno tipo I (PINP) e seus fragmentos, colágeno tipo I e seus fragmentos, sulfato de condroitina agrecano e fosfatase alcalina.

[0809] Em uma modalidade, biomarcadores são medidos através da obtenção de uma amostra biológica de um indivíduo que será administrado, está sendo administrado ou foi administrado com uma variante de CNP. Biomarcadores podem ser medidos usando técnicas conhecidas no campo incluindo, mas não limitado a, *Western Blot*, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e ensaio de atividade enzimática. A amostra biológica pode ser sangue, soro, urina ou outros fluidos biológicos.

[0810] Aspectos e detalhes adicionais da invenção serão aparentes a partir dos exemplos que seguem, que pretendem ser ilustrativos ao invés de limitantes.

F. Exemplos

Exemplo 1

Síntese de Variantes de CNP

[0811] Variantes de CNP foram preparadas usando os métodos descritos aqui. Substituições com aminoácidos ou peptidomiméticos naturais ou não naturais foram feitas, conforme indicado nas Tabelas 1-3 (mostradas no Exemplo 3), nos respectivos resíduos de aminoáci-

do na sequência do tipo selvagem de CNP22. Em certas variantes, aminoácidos adicionais foram adicionados às extremidades N-terminais e/ou C-terminais da sequência de CNP22 do tipo selvagem inteira ou uma porção da mesma (vide Tabela 3).

[0812] Foram também preparadas variantes de CNP onde uma porção de PEG (ou PEO) foi conjugada ao terminal N de CNP22 ou suas variantes (vide Tabela 4, mostrada no Exemplo 3). Reagentes de PEGuilação podem ser obtidos a partir de fontes comerciais mostradas na Tabela 5.

Tabela 5

| Vendedor | Nome do Produto | Nome | MW (Da) | Reagente de PEGuilação |
|---|---|---|---|---|
| NOF | Sunbright ME-200CS | mPEG20K | 20,000 | CH3(CH2CH2O)450-(CH2)5COO-NHS |
| NOF | Sunbright ME-050CS | mPEG5K | 5,000 | CH3(CH2CH2O)110-(CH2)5COO-NHS |
| Pierce | (Metil-PEG12)3-PEG4-NHS Éster | (mPEG12)3-PEG4 | 2,400 | [CH3(CH2CH2O)12]3-(CH2CH2O)4-NHCO(CH2)3-COO-NHS |
| NOF | Sunbright ME-020HS | mPEG2K | 2,000 | CH3(CH2CH2O)45-(CH2)5COO-NHS |
| NOF | Sunbright ME-020CS | mPEG2K | 2,000 | CH3(CH2CH2O)45-(CH2)5COO-NHS |
| NOF | Sunbright ME-010HS | mPEG1K | 1,000 | CH3(CH2CH2O)23-CO(CH2)2COO-NHS |
| Pierce | Metil PEG24-NHS Ester | MS(PEG)24 | 1,200 | CH3(CH2CH2O)24-(CH2)2COO-NHS |
| Pierce | EZ-Link NHS-PEG12-Biotin | PEO12-Biotin | 940 | Biotin-(CH2CH2O)12-(CH2)2COO-NHS |
| Pierce | Metil PEG12-NHS Ester | MS(PEG)12 | 690 | CH3(CH2CH2O)12-(CH2)2COO-NHS |
| Pierce | EZ-Link NHS-PEG4-Biotin | PEO4-biotin | 590 | Biotin-(CH2CH2O)4-(CH2)2COO-NHS |
| Pierce | Mono(lactosilamido) mono(succinimidil)suberato | LSS | 590 | |
| Pierce | EZ-link NHS-LC-LC-Biotin | LC-LC-Biotin | 570 | |
| Pierce | EZ-link NHS-LC-Biotin | LC-Biotin (LC = cadeia longa ) | 450 | |
| Pierce | EZ-link NHS-Biotin | Biotin | 340 | |

[0813] Os polímeros de PEG (também chamados PEO) compra-

dos da Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois) são monodispersos – isto é, eles contêm um polímero distinto único de um peso molecular particular. Em contraste, os polímeros de PEG comprados da NOF (Nippon Oil and Fat) são polidispersos – isto é, eles contêm uma mistura de polímeros tendo uma distribuição de pesos moleculares.

[0814] O CNP22 PEGuilado ou suas variantes, condições de reação e purificação são otimizados para cada conjugado de PEG-CNP. De acordo com um procedimento de PEGuilação geral, as misturas de reação contêm cerca de 1 mM de CNP22 ou uma variante do mesmo e cerca de 1 a 5 mM de PEG ativado pro NHS em tampão de fosfato de potássio, pH entre cerca de 5,0 e 6,5. Para mono-PEGuilar seletivamente no terminal N do peptídeo e minimizar a PEGuilação no sítio interno (por exemplo, Lys4 de CNP22), a reação de PEGuilação pode ser conduzida sob condições mais ácidas (por exemplo, em um pH entre cerca de 5,5 e 6,5) para promover seletivamente e então desativar o grupo amino primário mais básico na cadeia lateral lisina. Após cerca de 1 a 3 horas de incubação em temperatura ambiente, a reação de PEGuilação é extinta através da adição de tampão de glicina aquoso. Produtos de reação são então separados através de HPLC de fase reversa, otimizados para cada conjugado de PEG-CNP. Amostras de fracionamento são postas em aparelhos de *speedvac* até secagem e reconstituídas/formuladas em 1 mM de HCl. Identificação e pureza de cada produto de PEGC-CNP são determinadas através de cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC/MS).

Exemplo 2a

Produção Recombinante de Variantes de CNP

[0815] Variantes de CNP podem ser produzidas usando tecnologia recombinante. Em certas modalidades, as variantes de CNP são produzidas como proteínas de fusão compreendendo um peptídeo, proteína carreadora ou marcador clivável. Métodos exemplares para produ-

zir recombinantemente proteínas de fusão de CNP são revelados abaixo.

Materiais e Métodos

Clonagem de proteínas de fusão CNP em vetores de expressão

[0816] Fragmentos de DNA de CNP foram amplificados usando reação em cadeia da polimerase (PCR) e os fragmentos de PCR amplificados foram digestidos com Nde I e BamHI e clonados em vetor pET21a (Novagem, Gibbstown, Nova Jersey). O DNA da proteína de fusão de CNP foi sintetizado através de DNA2.0 e clonado em vetores de expressão diferentes (Tabela 6).

Tabela 6

| **Construto** | **Vetor** | **Produto** | **Clivagem Química** | **Produto Final** | **Expressão na linhagem *E. coli*** |
|---|---|---|---|---|---|
| pJexpress-TAF-CNP | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-CNP | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP | BL21; BL21(DE3) |
| pJexpress-KSI-CNP(M/N) | pJexpress404 | Corpos de inclusão KSI-CNP(M/N) | CNBr (Met-X) | CNP(M/N) | BL21 |
| pET-31b-KSI-CNP | pET-31b | Corpos de inclusão KSI-CNP | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP | BL21(DE3) |
| pET-32a-Trx-CNP | pET-32a | Proteína de fusão (solúvel) Trx-CNP | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP | BL21(DE3) |
| pMAL-CNP | pMAL-c2X | Proteína de fusão (solúvel MBP-CNP | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP | BL21(DE3) |

[0817] **CNP**: GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC [Gly-CNP37 (SEQ ID Nº: 75); **TAF**: fator de transcrição humano TAF12; **KSI**: isomerase de cetoesteroide; **MBP**: proteína de ligação à maltose; **Trx**: tiorredoxina

Expressão de proteínas de fusão CNP em *E. coli*

[0818] Plasmídeos de expressão de proteína de fusão CNP foram transformados em BL21 ou BL21(DE3) de *E. coli*. As células transformadas foram plaqueadas em placas LB contendo 100 ug/ml de carbenicilina ou 50 ug/ml de canamicina e incubadas da noite para o dia a 37°C. Uma colônia única foi pega e cultivada em 4 ml de meio LB con-

tendo 100 ug/ml de carbenicilina ou 50 ug/ml de canamicina a 37°C com agitação. Quando uma $OD_{600}$ de cultura bacteriana atingiu 0,6, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mM foi adicionado ao meio celular e o meio foi incubado a 37°C por 3 horas com agitação. Para coleta de célula, as células bacterianas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e os péletes de célula foram armazenados a -80°C. Os péletes de célula foram lisados com B-PER II Bacterial Extraction Reagent (PIERCE, 0,4 ml por 4 ml de cultura bacteriana) e Benzonase Nuclease (Novagen, 0,025 U/ml) em temperatura ambiente por 10 minutos. Extrato bruto bacteriano foi reservado e centrifugado para obter sobrenadante. O sobrenadante e os extratos brutos foram ensaiados quanto à expressão e à solubilidade da proteína de fusão CNP através de SDS-PAGE e *Western Blot.*

Detecção de expressão de proteína de fusão CNP com SDS-PAGE e *Western blot*

[0819] Dez uL de lisatos de célula e sobrenadantes solúveis foram ativados em eletroforese em dodecil sulfato de sódio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Gel Bis-tris 4-12% NuPAGE, tampão MES SDS). O gel foi tingido usando 20 ml de Imperial Protein Stain (Thermo Fisher, Rockford, Illinois) em temperatura ambiente por uma hora e o tingimento retirado com água. Para *Western blot*, a proteína foi transferida para membrana com Gel blot (Invitrogen). A membrana foi bloqueada em tampão TBS com leite 5% em temperatura ambiente por uma hora. Anticorpo anti-CNP22 de coelho (diluição 1:2500) (Bachem, Torarnce, Califórnia) foi adicionado à membrana, que foi então incubada em temperatura ambiente com agitação por duas horas e então a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS.

[0820] IgG anticoelho conjugado à fosfatase alcalina (AP) (diluição 1:5000) foi adicionado à membrana, que foi então incubada em tempe-

ratura ambiente com agitação por uma hora e então a membrana foi lavada 3 vezes com tampão de TBS. Dez ml de WESTERN BLUE® Stabilized Substrate (Promega, Madison, Wisconsin) foram adicionados à membrana, que foram então incubados em temperatura ambiente com agitação por 1 a 5 min e então a membrana foi lavada com tampão de TBS para remover tingimento em excesso.

Expressão de proteína de fusão TAF-CNP em BL21 de *E. coli*

[0821] Células (BL21 linhagem *E. coli*) expressando a proteína de fusão de TAF-CNP foram obtidas de estoque de glicerol armazenado a -80°C e foram cultivadas em 4 ml de meio LB contendo 50 ug/ml de canamicina a 37°C da noite para o dia com agitação (250 rpm). Quatro ml de cultura de célula cultivada da noite para o dia foram transferidos para 200 ml de meio LB contendo 50 ug/ml de canamicina e foram cultivados a 37°C com agitação (250 rpm). Quando a $OD_{600}$ atingiu 0,6, IPTG foi então adicionado para uma concentração final de 1 mM para induzir expressão de proteína a 37°C com agitação (250 rpm) por 3 horas. As células foram então giradas a 3000 rpm por 10 minutos e o pélete de célula resultante foi congelado a -80°C.

Purificação de corpos de inclusão TAF-CNP e clivagem com ácido fórmico

[0822] O pélete de célula (de cultura de 200 ml) foi ressuspenso em 25 ml de tampão B-PER II (PIERCE), o pélete foi sonificado por 10 minutos (50% 1 segundo, pausa 2 segundos) em gelo, centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C e então o pélete foi ressuspenso em 25 ml de tampão B-PER II 20x diluído. Isto foi repetido até que o sobrenadante ficou transparente (3-5 vezes). Um mL de corpos de inclusão TAF-CNP ressuspensos foi transferido para um tubo de 1,5 mL e centrifugado a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi dissolvido com 10 ul de ácido fórmico 88% e então 490 ul de água filtrada em Millipore foram adicionados imediatamente. O pélete foi

misturado bem através de vórtex e incubado a 55°C por 20 a 24 horas (70°C/6 horas são condições alternativas). Os produtos da clivagem de ácido fórmico foram ensaiados através de SDS-PAGE e LC/MS (C4RP).

Preparação da amostra de LC/MS

[0823] Corpos de inclusão foram isolados de cerca de 8 mL de cultura (OD cerca de 1,5) e o pélete foi solubilizado em 10 uL de formato nt. Pélete ressolubilizado foi imediatamente diluído para 2% ou 10% de concentração de formato final (0,5 mL) e incubado a 55°C por 21 horas (pH 2) (nebulosidade foi mais evidente na amostra de formato 2% no dia seguinte). Ambas as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 2 minutos. Vinte uL de sobrenadante foram injetados em um aparelho de LC/MS(C4 RP).

Resultados

Proteínas de fusão CNP foram expressas em *E. coli*

[0824] Todas as proteínas de fusão de CNP foram expressas em *E. coli* induzidas com IPTG 1 mM a 37°C por 3 horas (**figura 1**). Os construtos pJexpress-TAF-CNP, pJexpress-KSI-CNP(M/N) e pET-31b-KSI-CNP foram expressos como corpos de inclusão, enquanto os construtos pET-32a-Trx-CNP e pMAL-CNP foram expressos como proteínas de fusão solúveis. *Western blot* usando anticorpo anti-CNP22 confirmou a expressão da proteína de fusão CNP (**figura 1**).

CNP foi produzido a partir de corpos de inclusão TAF-CNP através de clivagem com ácido fórmico

[0825] Corpos de inclusão TAF-CNP foram parcialmente purificados e tratados com ácido fórmico 2% a 55°C por 20 a 24 horas (70°C/6 horas são condições alternativas). A maioria de TAF-CNP foi clivada e uma faixa extra tendo tamanho similar ao peptídeo Gly-CNP37 apareceu em SDS-PAGE (**figura 2**). A amostra clivada foi analisada mais através de LC/MS(C4 RP). Os resultados de LC/MS mostraram que CNP foi liberado em forma solúvel de corpos de inclusão TAF-CNP

após clivagem com ácido fórmico. Análise LC/MS indicou que clivagem com ácido fórmico das proteínas de fusão de CNP resultou em formação de Pro-Gly-CNP37 ciclizado (MW=4102). Cálculo de quantidades de proteína com base em análise sugeriu que cerca de 60 ug de CNP gerado em ácido fórmico foram produzidos a partir de 8 mL de cultura OD muito baixa. A partir de uma pequena escala (por exemplo, cerca de 8 mL) de cultura celular de OD baixo (por exemplo, OD 1,2), aproximadamente 8 ug/ml de CNP foram produzidos, enquanto fermentação de uma cultura de célula de escala maior (por exemplo, cerca de 8 L) ou OD maior (por exemplo, 38 OD) pode produzir aproximadamente 1 mg/ml de CNP.

Conclusão

[0826] Cinco construtos de expressão foram gerados para expressar proteínas de fusão CNP. Expressão de todos os cinco construtos produziu proteínas de fusão CNP solúveis (Trx e MBP) e insolúveis (TAF e KSI). Aproximadamente 1 mg/ml de CNP solúvel pode ser produzido a partir de corpos de inclusão TAF-CNP através de um procedimento de clivagem com ácido fórmico simples.

Exemplo 2B

Produção de Variantes de CNP Adicionais em *E. coli*

[0827] Produção recombinante de variantes de CNP foi realizada conforme descrito no Exemplo 2A. Neste exemplo, construtos de CNP adicionais foram gerados com um estojo de mutagênese direcionada a sítio QuikChange II XL (Stratagene) ou foram sintetizados através de DNA 2.0. Construtos de CNP e vetores de expressão adicionais são listados na Tabela 7.

| **Construto** | **Vetor** | **Produto** | **Clivagem Química** | **Produto Final** | **Expressão em linagem de *E. coli*** |
|---|---|---|---|---|---|
| pJexpress-TAF(C/A)-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A)-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF (C/A&4D/4E)-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A&4D/4E)-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF (C/A&10D/10E)-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21(DE3) |
| pJexpress-BMP-Pro-CNP38 | pJexpress401 | Corpos de inclusão BMP-Pro-CNP38 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP38 | BL21; BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-Pro-CNP37 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP37 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP37 | BL21; BL21(DE3) |
| pJexpress-BMP-Pro-CNP37 | pJexpress401 | Corpos de inclusão BMP-Pro-CNP37 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP37 | BL21; BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-Pro-HSA-CNP | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-Pro-HSA-CNP | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-HSA-CNP | BL21 |
| pJexpress-TAF | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-BMP | pJexpress401 | Corpos de inclusão BMP | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF(C/A) | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A) | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF(4D/4E) | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(4D/4E) | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF (C/A&4D/4E) | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A&4D/4E) | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF (C/A&10D/10E) | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF(C/A&10D/10E) | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-NL-(C/A & 6D/6E) | pJexpress401 | T Corpos de inclusão AF-NL-(C/A&6D/6E) | N/A | N/A | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-Pro-CNP53 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP53 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | Pro-CNP53 | BL21(DE3) |
| pJexpress-TAF-CNP34 | pJexpress401 | Corpos de inclusão TAF-CNP34 | Ácido Fórmico (Asp-Pro) | CNP34 | BL21(DE3) |

[0828] **CNP38**: GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC [Gly-CNP37 (SEQ ID Nº: 75)];

[0829] **Pro-CNP38**: PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKL-DRIGSMSGLGC [Pro-Gly-CNP37] (SEQ ID Nº: 145);

[0830] **CNP37**: QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMS GLGC (SEQ ID Nº: 60);

[0831] **HSA-CNP**: GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMS GLGC [HSA-CNP27 (SEQ ID Nº: 144)];

[0832] **Pro-CNP53**: PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKG ANKKGLSKGCFGLKLDRIG-SMSGLGC (SEQ ID Nº: 185);

[0833] **CNP34**: PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGL GC (SEQ ID Nº: 163);

[0834] **TAF-Pro-CNP38**: MVLTKKKLQDLVREVCPNEQLDEDVE-EMLLQIADDFIESVVTAA-CQLARHRKSS TLEVKDVQLHLERQWN-MWIMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHTGDDDDKHMDP GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID Nº: 196);

[0835] **TAF**: domínio de dobra de histona (HFD) de fator de trans-crição humano TAF12 e ligante do vetor pET-15b;

[0836] **TAF-NL**: HFD TAF12 sem um ligante;

[0837] **TAF12 HFD**:

[0838] VLTKKKLQDLVREVCPNEQLDEDVEEMLLQIADDFIES-VVTAACQLA-RHRKSSTLEVKDVQLHLERQWNMWI (SEQ ID Nº: 197);

[0839] **Ligante pET-15b**: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHTGDD DDKHMD (SEQ ID Nº: 195);

[0840] **TAF(C/A)**: cisteína em TAF é mudada para alanina;

[0841] **TAF(D/E)**: ácido aspártico em TAF é mudado para ácido glutâmico (número indica qual resíduo de aminoácido é mudado);

[0842] **TAF(C/A & D/E)**: cisteína e ácido aspártico em TAF são

mudados para alalina e ácido glutâmico, respectivamente;

[0843] **BMP**: proteína morfogenética do osso 2 com sete mutações C/A (cisteína em alanina);

[0844] **KSI**: cetoesteroide isomerase; **MBP**: proteína de ligação de maltose; **TRX**: tiorredoxina

Resultados

[0845] Todas as proteínas de fusão CNP foram expressas em *E. coli* induzida com IPTG 1 mM a 37°C por 3 horas. Os construtos pJexpress-BMP-Pro-CNP38, pJexpress-TAF-Pro-CNP37, pJexpress-BMP-Pro-CNP37, pJexpress-Pro-HSA-CNP, pJexpress-TAF e pJexpress-BMP foram expressos como corpos de inclusão. Um *Western Blot* com anticorpo anti-CNP foi usado para confirmar a expressão (**figura 3**).

Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") foi produzido a partir de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 através de clivagem com ácido fórmico

[0846] Ácido fórmico é usado como um desnaturante para proteínas de corpo de inclusão e pode clivar especificamente a ligação de peptídeo entre Asp e Pro sob condições otimizadas. Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP foram parcialmente purificados conforme acima descrito e tratados com ácido fórmico 50% a 25°C, 37°C, 42°C e 55% por 24 horas. A maioria do TAF-Pro-CNP38 foi clivada e uma faixa extra com um tamanho similar ao peptídeo Gly-CNP37 ("CNP38") mostrada em SDS-PAGE das clivagens de 37°C, 42°C e 55°C (**figura 4A**). As reações de clivagem a 37°C e 55°C foram neutralizadas com NaOH 10 M e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. O TAF-Pro-CNP38 não clivado, TAF e outros corpos de inclusão precipitaram nos péletes. Os sobrenadantes continham Pro-CNP38 solúvel e foram analisados mais através de LC/MS. O resultado de LC/MS mostrou que os sobrenadantes continham uma mistura de peptídeos clivados não específicos gerados pelo excesso de hidrólise ácida.

[0847] Quando corpos de inclusão TAF-Pro-CNP foram tratados

com ácido fórmico 2% e 10% a 55°C por 20 horas, a maioria de TAF-Pro-CNP38 foi clivada e uma faixa extra tendo um tamanho similar a Gly-CNP37 foi observada em SDS-PAGE (figura 4B). A amostra clivada foi analisada mais através de LC/MS. A análise de LC/MS mostrou que Pro-CNP38 correto foi liberado em forma solúvel de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 após clivagem com ácido fórmico. Os rendimentos de Pro-CNP38 de clivagem de ácido fórmico 2% e 10% foram similares (**figura 4C**).

Clivagem e neutralização de ácido fórmico para produção e purificação de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")

[0848] Ácido fórmico pode dissolver e clivar TAF-Pro-CNP38, BMP-Pro-CNP38 e outros corpos de inclusão. A neutralização do pH resulta em precipitação de proteínas/peptídeos de contaminação insolúveis (TAF-Pro-CNP38 e BMP-Pro-CNP38, TAF, BMP não clivados e outros). O Pro-CNP38 solúvel fica no sobrenadante após centrifugação. TAF-Pro-CNP38 e BMP-Pro-CNP38 foram clivados em ácido fórmico 2% a 55°C ou 70°C por 24 horas. As reações de clivagem foram neutralizadas com razão 1:1 de tampão de tris 0,5 M e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. Os resultados mostraram que os sobrenadantes continham peptídeos quase puros e não havia nenhuma perda de recuperação de Pro-CNP38 quando da neutralização. Isto é uma etapa simples e eficiente para purificação de Pro-CNP38.

Análise de condições variáveis para clivagem com ácido fórmico de corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 para produção de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")

[0849] Ácido fórmico pode especificamente clivar a ligação de peptídeo entre Asp e Pro sob condições otimizadas. Clivagem não específica de ligações de peptídeo entre Asp e quaisquer outros aminoácidos ou até mesmo clivagem não específica de qualquer ligação de peptídeo pode ocorrer se as condições de clivagem de ácido fórmico não

forem otimizadas. Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram clivados com ácido fórmico 2% a 42°C, 55°C ou 70°C por 6, 24 ou 48 horas. A **figura 5A** mostra que TAF-Pro-CNP38 foi clivado completamente a 70°C por 24 horas ou a 55°C por 48 horas. A clivagem a 70°C poderia estar completa dentro de 17 horas (**figura 5B**). Embora a clivagem a 70°C/24 horas tenha dado o rendimento mais alto, os produtos de clivagem não específicos (por exemplo, o peptídeo com peso molecular de 3142 gerado de Pro-CNP38 através da clivagem entre a ligação de peptídeo Asp e Arg) aumentaram drasticamente (**figura 5C**).

[0850] O rendimento e a pureza de produção de Pro-CNP38 foram aperfeiçoados quando corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram purificados ou tratados com tampão B-PER II antes da clivagem com ácido fórmico. Devido ao fato do tampão BE-PER II conter detergente octiltioglicosídeo e ele ser relativamente barato, outros detergentes ou tampões geralmente usados foram testados para produção de Pro-CNP38 em grande escala. Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram ressuspensos em detergentes diferentes (Octilsacarose; Triton x100; Tween-20; NP40; CA-630 (B-PER II; diluição 1/20 B-PER II; B-PER; tampão de fosfato B-PER; tris 25 mM; NaCl 150 mM, pH 7,9; tris 25 mM; pH 7,5; água filtrada; PBS) e incubados em temperatura ambiente (TA) por 24 horas. Todos os detergentes eram 1% em tampão de tris 25 mM, pH 7,5. Após incubação em detergente ou tampão, corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram clivados por 2% de ácido fórmico a 55°C por 22 horas. Os resultados mostraram que BPER II continuou a exibir bom rendimento, e resultados positivos foram também obtidos com CA630 e Triton X-100.

<u>Produtos de clivagem proteolítica de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38")</u>

[0851] Uma protease não identificada, possivelmente uma protease associada à membrana, clivou o peptídeo Pro-CNP38 (produzido da linhagem BL21, MW 4102) em dois peptídeos durante purifica-

ção de Pro-CNP38, resultando em peptídeos PGQEHPNAR (MW 1004) (SEQ ID Nº: 198) e KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (MW 3115) (SEQ ID Nº: 199). Sem ser limitado pela teoria, uma razão possível pela qual detergentes podem aperfeiçoar o rendimento e a pureza de Pro-CNP38 é que os detergentes podem remover a maioria, mas possivelmente não toda, a protease não identificada. Temperatura alta, pH básico e EDTA foram testados para identificar se esses agentes poderiam inibir a clivagem de protease. Corpos de inclusão TAF-Pro-CNP38 foram incubados em TA ou 120°C por 2 h e centrifugados a 14000 rpm por 15 min. Os péletes foram ressuspensos em ácido fórmico 2% e incubados a 55°C por 70°C por 18 horas. Uma razão 1:1 de Tris 0,5M foi adicionada para neutralizar a clivagem. As amostras neutralizadas foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 min e os sobrenadantes foram deixados em TA por 6 horas ou 22 horas com ou sem EDTA 10 mM, pH 10. A clivagem proteolítica foi ensaiada através de LC/MS (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resultado de LC/MS de clivagem proteolítica de Pro-CNP38

| Amostra | | Área de Pico A210 | Conc. de Proteína (mg/mL) | | Porcentagen MW4102 | Porcentagem MW3115 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | H 55C | 942 | 0,04 | * | 91,8 | 8,2 |
| 2 | H 70 0 | 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 pH10 | 3425 | 0,13 | | 97,5 | 2,4 |

[0852] Todas as amostras (8-12) clivadas a 70°C mostraram clivagem proteolítica limitada (menos do que 4% de clivagem de Pro-

CNP38). Quase 40%de Pro-CNP38 foram clivados por protease quando clivagem foi realizada a 55°C (amostra 7). pH básico e EDTA não influenciaram a clivagem proteolítica não específica. Temperatura alta (120°C por duas horas) clivou não especificamente Pro-CNP38.

[0853] Deve ser notado que a linhagem BL21(DE3) da Stratagene não tem a protease não identificada.

Produção de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") e outras variantes de CNP de construtos diferentes:

[0854] Pro-CNP38 pode ser produzido em grande escala em *E. coli* por meio de superexpressão de uma proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 como corpos de inclusão seguido por clivagem com ácido fórmico da proteína de fusão. Seguindo os métodos descritos aqui, outras proteínas de fusão TAF-CNP (TAF-CNP34 e TAF-Pro-CNP53) foram expressas como corpos de inclusão e então clivadas com ácido fórmico para gerar as variantes de CNP CNP34 e Pro-CNP53. A **figura 6** mostra a expressão de TAF-CNP34, a **figura 7** a expressão de TAF-Pro-CNP53, a **figura 8** os produtos de clivagem de ácido fórmico de TAF-CNP34 e TAF-Pro-CNP53, a **figura 9** o pico para CNP-34 em uma cromatograma de LC/MS e a **figura 10** o pico para Pro-CNP53 em um cromatograma de LC/MS.

[0855] Uso de ácido fórmico pode resultar em clivagem(ns) não específica(s) em ligação(ões) de peptídeo outros que não a ligação Asp-Pro não direcionada. Para aperfeiçoar a pureza e o título geral do produto de clivagem de ácido fórmico desejado, resíduos diferentes de ácido aspártico em TAF12 ou seus fragmentos foram mudados para ácido glutâmico. Além disso, um ou mais resíduos cisteína em TAF12 ou seus fragmentos foram mudados para alanina para prevenir formação de ligação dissulfeto não específica. Todas as proteínas de fusão TAF-Pro-CNP38 tendo mutações em TAF12 foram expressas como corpos de inclusão e clivadas com ácido fórmico para produzir Pro-

CNP38. A **figura 7** mostra a expressão de TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 e TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38, a **figura 11** a expressão de TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38 e TAF(4D/4E)-Pro-CNP38, a **figura 12** os produtos de clivagem de ácido fórmico de TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 e TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38 e a **figura 13** os produtos de clivagem de ácido fórmico de TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNO38 e TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38. A **Tabela 9** sumariza a pureza (antes da purificação) e título de Pro-CNP38 obtido de vários construtos de TAF-Pro-CNP38.

Tabela 9

| Construto | Pureza | Título (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 & 4D/4E)-Pro-CNP38 | 42% | 58 |
| pJexpress-TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38* | 32% | 26 |
| pJexpress-TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 | 50% | 55 |

*Células com pJexpress-TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38 cresceram mais lentamente e a densidade de célula final ($OD_{600}$) foi menor comparado com outros construtos TAF-Pro-CNP38.

Produção em grande escala de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") através de fermentação e clivagem com ácido fórmico

[0856] Células BL21(DE3) compreendendo o construto pJexpress-TAF-CNP foram cultivadas em um fermentador de 10 litros a 37°C por cerca de 16-17 h até que o $OD_{600}$ atingisse 64. As células foram então cultivadas/cultivada s na presença de IPTG 1 mM em cerca de 35-37°C para induzir a expressão da proteína de fusão TAF-Pro-CNP38, por cerca de 7-8 horas, até que a $OD_{600}$ atingisse 160. A fermentação produziu um título de 9 g/l de TAF-Pro-CNP38. A **figura 14** mostra um *Western blot* da proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 produzida na fermentação.

[0857] Um pélete de célula recuperado de 750 mL de cultura de

célula dos 10L de fermentação foi ressuspenso em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e lisado por três passos através de um homogeneizador de pressão (10.000 bar). O lisato resultante foi centrifugado a 6.500 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A fração de pélete contendo corpos de inclusão de proteína de fusão TAF-Pro-CNP38 insolúveis foi ressuspensa em 500 mL de PBS com um rotoestator. A suspensão foi centrifugada a 6.500 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pélete de corpo de inclusão resultante foi ressuspenso em 500 mL de água com um rotoestator e incubado a 55°C por 30 minutos. 250 mL de ácido fórmico 6% foram adicionados à suspensão de corpo de inclusão aquecida para uma concentração final de ácido fórmico 2% e incubados a 55°C por 20-24 horas. 50 mL de $Na_2HPO_4$ 400 mM foi adicionado após 20-24 horas para começar a neutralização da reação de clivagem de ácido fórmico e a mistura resultante foi titulada com NaOH 50% p/v para pH 6,9-7,4 e deixada em temperatura ambiente por 30 minutos. Quando da neutralização, um precipitado pesado se formou e foi removido através de centrifugação a 6.500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retido e continha em média 1,3 g/L de cultura de Pro-CNP38 80% puro. A maioria das proteínas e peptídeos relacionados à *E. coli* e TAF permaneceu no pélete.

[0858] O Pro-CNP38 solúvel resultante da clivagem de ácido fórmico e sobrenadante neutralizado era 80% puro e continha uma mistura de peptídeos Pro-CNP38 linear e ciclizado junto com outras impurezas relacionadas a produto. O sobrenadante de pH neutro contendo Pro-CNP38 foi filtrado estéril. Purificação adicional através de cromatografia de troca de ânion usando uma coluna Fractogel TMAE Hi-CAP (EMD Bioscience) para remover DNA, endotoxinas e contaminantes de peptídeo, que devem se ligar à coluna, foi realizada em pH 7-7,4. A fração de fluxo continha Pro-CNP38 parcialmente ciclizado. Sulfato

cúprico foi adicionado à fração de fluxo para uma concentração final de 10 uM e incubado em temperatura ambiente por 1 hora. A adição de $Cu^{++}$ em pH neutro catalisou a oxidação de grupos sulfidrila de cisteína livre no peptídeo para formar uma ligação dissulfeto intramolecular, resultando em Pro-CNP38 ciclizado 100% e nenhum peptídeo linear detectável. A condutividade da solução foi ajustada para <15 mS/cm através da adição de água. Cromatografia de troca de cátion usando uma coluna de SP-Sepharose (GE Healthcare) e um tampão de fosfato de sódio (pH 7) foi então realizada para remover quaisquer DNA e endotoxinas restantes no fluxo e ainda purificar Pro-CNP38 para cerca de 95-96% de pureza com impurezas relacionadas com não produto 0,5%. A **figura 15** é um SDS-PAGE de frações de eluente da coluna SP-Sepharose; as concentrações mais altas de Pro-CNP38 foram encontradas nas frações 22 a 30. Análise de HPLC/MS de fase reversa de fração não agrupada 24 indica a presença de Pro-CNP38 90%, Pro-CNP38 5% com um resíduo metionina oxidado, Pro-CNO38 3% clivado na ligação Gly-Cys para formar CNP-17 e Pro-CNP38 1,6% clivado na ligação Asp-Arg do domínio cíclico. O rendimento de peptídeo Pro-CNP38 puro quando da purificação final foi 0,9 g/mL de cultura de célula (recuperação total 36%).

[0859] Pro-CNP38 coletado de cinco purificações separadas foi agrupado para formulação. O produto agrupado continha Pro-CNP38 93,5%, Pro-CNP38 3,3% com um resíduo metionina oxidado, Pro-CNP38 desaminado 1,3% e pro-CNP38 1% clivado na ligação Gl-Cys para formar CNP-17. As amostras foram diluídas com fosfato de sódio 50 mM (pH 7) para uma condutividade de 10 mS/cm e carregadas em uma coluna CM-Sepharose (GE-Healthcare) para concentração e troca de tampão. A propriedade de troca de cátion fraca da resina CM-Sepharose permite que peptídeos dissociem da coluna com soluções ácidas fracas ao invés de gradientes de sal típicos. Concentrações de

ácido requeridas para dissociação de Pro-CNP38 da coluna de CM-Sepharose dependiam da carga de coluna. A 50mg de Pro-CNP38 por mL de resina, HCl 10 mM foi suficiente para eluição de Pro-CNP38. A 9 mg de Pro-CNP38 por mL de resina, HCl 50 mM foi requerido para eluição. Quando a carga foi 9 mg de Pro-CNP38 por mL de resina, Pro-CNP38 eluiu em menos do que um volume de coluna, que concentrou significantemente o peptídeo. A fração de eluato continha 20,3 mg/mL de Pro-CNP38 95% puro, junto com Pro-CNO38 3% com um resíduo metionina oxidado, Pro-CNP38 desaminado 1% e Pro-CNP38 <1% clivado na ligação Glys-Cys para formar CNP-17. A solução concentrada de Pro-CNP38 em ácido fraco é adequada para diluição em tampões apropriados para formulações ou líquidas ou liofilizadas.

Exemplo 3

Clivagem de Variantes de CNP Através de Endopeptidase Neutra *In vitro*

[0860] Para determinar os efeitos de substituições de aminoácido, extensões de aminoácido, modificações de estrutura principal, modificações de cadeia lateral e PEGuilação sobre a susceptibilidade de variantes de CNP à clivagem por endopeptidase neutra (NEP), ensaios de clivagem de peptídeo foram realizados usando um ensaio *in vitro* que monitorou o desaparecimento da variante de CNP não clivada.

[0861] NEP humana recombinante (concentração final 1 ug/mL) foi adicionada à variante de CNP 100 uM diluída em Tris 0,1M, pH 7. A mistura de reação foi incubada a 37°C por vários períodos de tempo e a reação foi extinta com EDTA (final 10 mM) seguido por desnaturação com calor. A mistura de reação foi reduzida e então os produtos de reação foram analisados usando HPLC e espectroscopia de massa. A meia-vida da variante de CNP foi calculada com base no desaparecimento de variante de CNP intacta com o tempo. Os resultados para variantes de CNP digeridas foram comparados com uma digestão de

wtCNP22 paralela e normalizados para os resultados para CNP22 100 uM digerido por 1 mg/mL de NEP (t1/2 = 80 min).

[0862] A **Tabela 1** lista meias-vidas, com base no ensaio de clivagem por NEP *in vitro*, de várias variantes de CNP tendo modificações na estrutura principal ou cadeia lateral. Remoção de três dos seis sítios de clivagem por NEP em Análogo L, não obstante, resultou em uma meia-vida substancialmente mais curta. Das variantes de CNP testadas, a maior resistência à clivagem por NEP foi exibida pelo Análogo N, que contém o enantiômero D de todos os 22 aminoácidos de CNP22, e pelo Análogo M, que tem uma ligação amida N-metilada em ambos o Leu9 e Leu11. No entanto, ambos os análogos N e M falharam em estimular produção de cGMP (vide abaixo).

[0863] Comparando as meias-vidas de Análogos A, B, E, F, G e H umas com as outras, as meias-vidas foram determinadas ser cerca de 1,5 a cerca de 2,5 vezes mais longas para os análogos E e G comparado com aquelas para os Análogos A, B, F e H. Todos esses seis análogos mostraram resistência ou resistência aperfeiçoada à clivagem na ligação Cys6-Phe7 com relação a wtCNP22 (dados não mostrados). A ordem de classificação de resistência de análogo à NEP em 1 ug/ml, com base em meia-vida, é Análogo G (3-Cl-Phe) ≥ Análogo E (D-Phe) > Análogo H ("beta-2-Phe"), Análogo B (N-Me-Phe) e Análogo F (t-Bu-Gly) = wtCNP22 > Análogo A (Cys-$CH_2$-NH). Os Análogos E e G têm meia-vida 1,5 vez mais longa em comparação com wtCNP22. Além da resistência à clivagem da ligação Cys6-Phe7, os Análogos B, E, F, G e H também exibiram resistência à clivagem da ligação Gly8-Leu9 na presença de 1 ug/mL de NEP (dados não mostrados). Esses resultados indicam que variantes de CNP tendo modificações de estrutura principal ou cadeia lateral entre Cys6 e Gly8 podem ser resistentes à clivagem por NEP da ligação Cys6-Phe7 e/ou ligação de Gly8-Leu9, mas não têm necessariamente resistência geral aperfeiçoada à

NEP ou uma meia-vida mais longa do que CNP22. Os resultados parecem ser contrários aos relatos na literatura que NEP primeiro cliva na ligação Cys6-Phe7 de CNP22 e então em outro local.

Tabela 1

| **Análogo** | **Modificações da Estrutura Principal da e Cadeia Lateral** | **Resposta de cGMP rel. a 1 uM de CNP22[1]** | | **Clivagem por NEP** |
|---|---|---|---|---|
| | **Peptídeo Natriurético** | **10 nM** | **1 uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| | CNP22 (SEQ ID Nº: 1) | 46 ± 10 | 100 ± 13 | 80[2] |
| N | D-CNP22 (todos D-aminoácidos) (SEQ ID Nº: 115) | 2 | 1 | >> 160 |
| A | CNP22, C6-CH2-NH (carbonila reduzida) (SEQ ID Nº: 56) | 6 | 66 | 55 |
| 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-CH2-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-fenilpropionil) (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] Estimulação de produção de cGMP em células NIH3T3 pelo peptídeo natriurético relativo à produção de cGMP na presença de 1 uM de CNP22

[2] $t_{1/2}$ de Resistencia de NEP a CNP22 foi em média 80 min. Devido a variações em atividade catalítica de NEP entre os experimentos, todas as digestões $t_{1/2}$ de CNP22 foram normalizadas para 80 min e o coeficiente de diferença foi usado para calcular $t_{1/2}$ análogo em ca-

da experimento para obter um $t_{1/2}$ ajustado.

ND = Não determinado

[0864] A **Tabela 2** lista as meias-vidas, com base no ensaio de clivagem por NEP *in vitro*, de várias variantes de CNP tendo substituições com aminoácidos naturais e/ou não naturais. Das variantes testadas, a resistência maior à clivagem por NEP foi mostrada pelo Análogo BK, que tem substituições K4R e G15S, e Análogo BJ, que tem substituições K4R e G15N.

Tabela 2

| **Análogo** | **Mutações de Especificidade** | **Resposta de cGMP relativa a 1 uM de CNP22[1]** | | **Clivagem de NEP** |
|---|---|---|---|---|
| | **Peptídeo Natriurético** | **10nM** | **1uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| | 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 |
| BF | CNP22, K4R, K10Cit (SEQ ID Nº: 110) | 6 | 33 | ND |
| BG | CNP22, K4R, K10Q (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-butil-Ala (SEQ ID Nº: 104) | 1 | 21 | ND |
| AT | CNP22, G1E, 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 |

| Análogo | Mutações de Especificidade | Resposta de cGMP relativa a 1 uM de CNP22[1] | | Clivagem de NEP |
|---|---|---|---|---|
| | Peptídeo Natriurético | 10nM | 1uM | ($t_{1/2}$, min) |
| BW | CNP22, K4R, G21R (SEQ ID Nº: 132) | 20 | 21 | ND |
| | ANP | 10 | 23 | ND |

[1] Estimulação de produção de cGMP em células NIH3T3 pelo peptídeo natriurético relativo à produção de cGMP na presença de 1 uM de CNP22

[2] $t_{1/2}$ de Resistência de NEP a CNP22 foi em média 80 min. Devido a variações em atividade catalítica de NEP entre os experimentos, todas as digestões $t_{1/2}$ de CNP22 foram normalizadas para 80 min e o coeficiente de diferença foi usado para calcular $t_{1/2}$ análogo em cada experimento para obter um $t_{1/2}$ ajustado.

ND = Não determinado

[0865] A **Tabela** 3 lista as meias-vidas, com base no ensaio de clivagem por NEP *in vitro*, de variantes de CNP tendo modificações N-terminais e/ou C-terminais, incluindo extensões de aminoácido. Dos análogos testados, os Análogos AZ, CC, CF, BL, CS, CK e CL, Pro-Gly-CNP37 e HSA-CNP27 eram mais resistentes à degradação por NEP.

Tabela 3

| | Modificações N e C Terminais | Resposta de cGMP rel. a 1 uM de CNP22[1] | | Clivagem de NEP |
|---|---|---|---|---|
| | Peptídeo Natriurético | 10nM | 1uM | ($t_{1/2}$, min) |
| | CNP22 | 46 ± 10 | 100 ± 13 | 80 |
| BC | Ácido pentanoico (N-term.)-CNP22, G1E (SEQ ID Nº: 109) | ND | ND | ND |
| BB | Ácido pentanoico (N-term.)-CNP22, G1E (SEQ ID Nº: 108) | 32 ± 4 | 84 ± 19 | 45-65 |
| AV | Ácido pentanoico (N-term.)-CNP22, G1E, K4E (SEQ ID Nº: 106) | ND | ND | 120 |
| AW | Ácido Heptanoico (N-term.)-CNP22, G1E, K4E (SEQ ID Nº: 107) | ND | ND | < 20 |
| AX | CNP17 (delta N-term) (SEQ ID Nº: 2) | 18 | 69 | ND |
| | 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 |

| | Modificações N e C Terminais | Resposta de cGMP rel. a 1 uM de CNP22[1] | | Clivagem de NEP |
|---|---|---|---|---|
| | **Peptídeo Natriurético** | **10nM** | **1uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| 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 (fragment 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 (fragment de HRGP) (SEQ ID Nº: 128) | 14 ± 5 | 77 ± 12 | ND |
| CZ | FGIPMDRIGRNPR-CNP22 ("inibidor de NPR-C" osteocrina) (SEQ ID Nº: 82) | ND | ND | ND |

| | Modificações N e C Terminais | Resposta de cGMP rel. a 1 uM de CNP22[1] | | Clivagem de NEP |
|---|---|---|---|---|
| | **Peptídeo Natriurético** | **10nM** | **1uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| DA | GKRTGQYKLGSKTGPGPK-CNP22 (FGF2 fragmento de "domínio de ligação à heparina") (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 (fibrinogênio) (SEQ ID Nº: 87) | 12 | 115 | ND |
| CM | GQPSSSSQSTGANQQ-CNP22, K4R (fibronectina) (SEQ ID Nº: 86) | ND | ND | ND |
| CO | GSTGQWHSESGANQQ-CNP22, K4R (fibrinogênio) (SEQ ID Nº: 88) | 2 | 33 | ND |
| CP | GSSSSSSSSSGANQQ-CNP22, K4R (dedo de zinco) (SEQ ID Nº: 89) | ND | ND | ND |
| CD | SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH ("caudas 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.--N-term. dímero/disuccinimidil glutarato (SEQ ID Nº: 134) | 19 | 44 | ND |
| | CNP22, K4R, K10R, N-term.--N.-term. dímero/Bis-PEO5 (SEQ ID Nº: 135) | 19 | 41 | ND |
| BM | CNP53 (SEQ ID Nº: 4) | 61 | 101 | >> 160 |
| | ANP | 10 | 23 | ND |

[1] Estimulação de produção de cGMP em células NIH3T3 pelo peptídeo natriurético relativo à produção de cGMP na presença de 1 uM de CNP22

[2] $t_{1/2}$ de Resistência de NEP a CNP22 foi em média 80 min. Devido a variações em atividade catalítica de NEP entre os experimentos, todas as digestões $t_{1/2}$ de CNP22 foram normalizadas para 80 min e o coeficiente de diferença foi usado para calcular $t_{1/2}$ análogo em cada experimento para obter um $t_{1/2}$ ajustado.

ND = Não determinado

[0866] A **Tabela 4** lista as meias-vidas, com base no ensaio de

clivagem por NEP *in vitro*, de variantes de CNP conjugadas a polímeros de PEG (ou PEO) no terminal N. Todas as variantes de CNP PEGuiladas testadas e mostradas na Tabela 4 mostram resistência ou resistência aumenta à clivagem por NEP exceto pelo PEO12-GANPR-CNP22(K4R), que tinha a mesma meia-vida que wtCNP22. PEGuilação N-terminal de CNP22 tendo uma substituição K4G não parece conferir aperfeiçoamento substancial em resistência à NEP. Por exemplo, PEG2K-CNP22(K4G) era apenas ligeiramente mais resistente à clivagem por NEP do que CNP22 (dados não mostrados), enquanto PEG2K-CNP22 tinha uma meia-vida muito mais longa do que CNP22.

Tabela 4

| **PEGuilação N-Terminal** | | **Resposta de cGMP rel. a 1 uM CNP22[1]** | | **Clivagem por NEP** |
|---|---|---|---|---|
| **Peptídeo Natriurético** | **PEG** | **10nM** | **1uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| CNP22 | | 46 ± 10 | 100 ± 13 | 80 |
| CNP22 | PEG20K | 0 | 15 | >> 160 |
| CNP22 | PEG5K | 8 ± 1 | 20 ± 7 | >> 160 |
| CNP22 | PEG2K | 6 ± 2 | 32 ± 4 | >> 160 |
| CNP22 | PEO4-$(PEO12)_3$ (ramificada) | 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 |

| PEGuilação N-Terminal | | Resposta de cGMP rel. a 1 uM CNP22[1] | | Clivagem por NEP |
|---|---|---|---|---|
| **Peptídeo Natriurético** | **PEG** | **10nM** | **1uM** | **($t_{1/2}$, min)** |
| 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] Estimulação de produção de cGMP em células NIH3T3 pelo peptídeo natriurético relativo à produção de cGMP na presença de 1 uM de CNP22

[2] $t_{1/2}$ de Resistencia de NEP a CNP22 foi em média 80 min. Devido a variações em atividade catalítica de NEP entre os experimentos, todas as digestões $t_{1/2}$ de CNP22 foram normalizadas para 80 min e o coeficiente de diferença foi usado para calcular $t_{1/2}$ análogo em cada experimento para obter um $t_{1/2}$ ajustado.

ND = Não determinado

[0867] A **figura 16** mostra o perfil de resistência à NEP de cinco conjugados PEGuilados N-terminais de CNP22. Os peptídeos de CNP22 conjugados a polímeros de PEG (ou PEO) de massa alta exibiram resistência aumentada à degradação por NEP. Em particular, PEO24-CNP22, PEG2K-CNP22 e PEG5K-CNP22 eram resistentes à degradação por NEP durante o período de ensaio de 160 minutos.

[0868] A **figura 17** mostra o perfil de resistência à NEP de variantes de CNP (Análogo BL), NCP53 e GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tendo uma extensão de aminoácido N-terminal. Como pode ser claramente visto, ambos o CNP37 e CNP53 eram resistentes à degradação por NEP neste ensaio *in vitro*, enquanto GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinha a mesma labilidade à hidrólise por NEP que CNP22.

[0869] A **figura 18** mostra o perfil de resistência à NEP de CNP17 e GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) conjugados a uma porção de PEG (ou PEO) no terminal N. PEGuilação de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) aperfeiçoou muito a resistência à NEP desta variante de

CNP, com PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) sendo completamente resistente à clivagem por NEP durante o período de ensaio de 160 minutos. Aumento da massa por porção de PEO de a partir de cerca de 0,6 kDa (PEO12) a cerca de 1,2 kDa (PEO24) aperfeiçoou a resistência à NEP de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) PEGuilado. PEGuilação de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) para uma porção de PEO24 monodispersa ao invés de uma porção PEG1K polidispersa também aperfeiçoou a resistência à NEP. Finalmente, embora ambos o PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) e o PEG2K-CNP17 tenham uma massa total similar (tendo em mente que PEG2K é polidisperso), o primeiro mostrou resistência à NEP substancialmente melhor.

[0870] Ensaios de resistência à NEP foram também realizados em wtCNP22 e variantes de CNP G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA", SEQ ID Nº: 144) e PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36). A **figura 19** mostra que G-CNP37 e CNP27-HSA eram completamente resistentes à clivagem por NEP e CNP27-PEO12 exibe estabilidade muito maior à degradação por NEP comparado com wtCNP22.

Exemplo 4

Estimulação de Variante de CNP de Produção de cGMP em Células NIH3T3

[0871] Para determinar a atividade funcional de variantes de CNP, a produção de cGMP foi medida em células NIH3T3 expostas a variantes de CNP. Células NIH3T3 de murino expressam endogenamente o receptor de sinalização de CNP, NPR-B, que compartilha 98% de identidade de sequência de proteína com NPR-B humana. Células NIH3T3 foram cultivadas em Meio da Eagle Modificado com da Dulbecco suplementado com soro bovino fetal 10% e antibióticos a 37°C com $CO_2$ 5%. Vinte e quatro a 48 horas antes da sinalização, as células foram passadas para placas de 12 poços com uma densidade de 2-5 x $10^5$

células por poço no momento do ensaio. Variantes de CNP foram ressuspensas em HCl 1 mM para uma concentração de estoque de 1 mg/mL (455 uM para wtCNP22) e subsequentemente diluídas para uma solução de estoque de trabalho 30 uM com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Diluições seriais de dez vezes foram preparadas em solução salina tamponada com fosfato. Meio de cultura foi removido das células e substituído com 0,4 mL de PBS/meio da Eagle Modificado com da Dulbecco (50/50, v/v) contendo 0,75 mM de isobutilmetilxantina. As placas foram incubadas a 37°C, $CO_2$ 5% por 15 minutos antes da adição de 0,2 mL de variantes de CNP em PBS e incubação continuou a 37°C por 15 minutos. As reações foram paradas através da adição de 0,2 mL de tampão de lise fornecido com o estojo de ensaio CatchPoint cGMP (Molecular Devices) e produção de cGMP foi determinada com o CatchPoint cGMP Assay (Molecular Devices). Todos os experimentos de estimulação foram realizados em duplicata.

[0872] As **Tabelas 1-4** sumarizam a habilidade de variantes de CNP tendo modificações na estrutura principal ou cadeia lateral, substituições de aminoácido, extensões de aminoácido N-terminal e/ou PEGuilação N-terminal, respectivamente, para estimular a produção de cGMP em células NIH3T3. Em todas as quatro tabelas, os valores para produção de cGMP em células NIH3T3 expostas a variantes de CNP 10 nM ou 1 uM são normalizados para número celular e produção de cGMP na presença de 1 uM de wtCNP22.

[0873] Com relação aos resultados na **Tabela 1**, apenas o Análogo G tendo 3-Cl-Phe na posição 7 mostrou substancialmente a mesma atividade de estimulação de NPR-B em 1 uM que wtCNP22. Com relação à **Tabela 2**, várias variantes de CNP com substituições de aminoácido, incluindo Análogos AH, BO, AB, BH, BZ, BX e BR, mostraram atividade de estimulação de NPR-B substancialmente similares a wtCNP22.

[0874] Considerando os resultados na **Tabela 3**, muitas variantes de CNP tendo modificações N-terminais e/ou C-terminais, incluindo extensões de aminoácido, exibiram atividade de estimulação de NPR-B comparáveis a wtCNP22. As variantes de CNP funcionais incluem Análogo BB, que é CNP22(G1E) ligado a ácido heptanoico no terminal N, e Análogo CD, que é o domínio cíclico de CNP22 ("CNP17" retendo as sequências Cys6 a Cys22), conjugados às "caudas" N-terminais e C-terminais de BNP. A **figura 20** ilustra que GANRR-CNP22(K4R), CNP37 (SEQ ID Nº: 36) (Análogo BL) e CNP53 tinham todos atividade de estimulação de NPR-B similares a wtCNO22 no ensaio *in vitro*.

[0875] Notável a partir da **Tabela 3** é que dentre as variantes de CNP ensaiadas para ambas a funcionalidade de CNP e resistência à NEP, o Análogo AZ (R-CNP22(K4R)), o Análogo CC, o Análogo CF, o Análogo BL (CNP37), o Análogo DB (Gly-CNP37) e GHKSEVAHRFK-CNP27 (HSA-CNP27) (SEQ ID Nº: 144) tinham todos atividade de estimulação de NPR-B substancialmente similares a CNP22 enquanto sendo substancialmente mais resistentes à clivagem por NEP do que CNP22.

[0876] Com relação aos resultados na **Tabela 4**, nove variantes de CNP PEGuiladas N-terminais a 1 uM estimularam produção de cGMP para pelo menos cerca de 70% do nível atingido por wtCNP22. Vários aspectos notáveis aparecem na Tabela 4. Primeiro, PEGuilação N-terminal de GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) com um polímero PEO monodisperso (PEO12 é cerca de 0,6 kDa, PEO24 cerca de 1,2 kDa) resultou em melhor funcionalidade de NPR-B do que aquela com um polímero de PEG polidisperso (PEG1K tem um peso molecular médio numérico de polímero (Mn) em torno de 1 kDa, PEG2K em torno de 2 kDa) (vide também **figura 21**). Segundo, PEGuilação N-terminal de wtCNP22 com um polímero de PEG polidisperso de $M_n$ alto (PEG1K, PEG2K, PEG5K e PEG20K) ou com um polímero de PEO

monodisperso de massa maior (PEG12 e PEO24) correspondentemente diminuiu a habilidade de ativação de NPR-B das variantes de CNP (vide também figura 22). Terceiro, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36), tendo a extensão GANRR N-terminal (SEQ ID Nº: 8), estimulou maior produção de cGMP do que PEO24-CNP22 e PEO24-CNP22(K4R). Também notável é que dentre as variantes de CNP PE-Guiladas N-terminais ensaiadas para ambas a funcionalidade de CNP e resistência à NEP, PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinham todos atividade de estimulação de NPR-B substancialmente similares a CNP22 enquanto sendo mais resistentes à degradação por NEP do que CNP22.

[0877] Dentre as variantes de CNP listadas nas **Tabelas 1-4** e ensaiadas para ambas a funcionalidade de CNP e resistência à NEP, Análogos G, BK, AZ, CC, CF, BL e DB, Pro-Gly-CNP37, HSA-CNP27 (GHKSEVAHRFK-CNP27) (SEQ ID Nº: 144), PEG1K-CNP22, (PEO12)-biotin-CNP22, PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36), e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinham todos atividade de estimulação de NPR-B substancialmente similares a wtCNP22 enquanto sendo substancialmente mais resistentes à clivagem por NEP do que wtCNP22.

[0878] Ensaios de produção de cGMP foram também realizados em wtCNP22 e variantes de CNP G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("CNP27-HSA", SEQ ID Nº: 144), wtCNP29 e PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36). A **figura 23** mostra que CNP22 e todas as variantes de CNP ensaiadas induziram produção de níveis de cGMP similares na dose baixa ou alta de CNP.

Exemplo 5

Especificidade de Ligação para NPR-A, NPR-B e NPR-C

Ensaio de Competição de Sinalização

[0879] Para determinar a especificidade de ligação de variantes de CNP para o receptor de excreção NPR-C, um ensaio de competição de ligação é realizado. Plasmídeos de expressão para NPR-B ou NPR-C humano (cada um comprado da OriGene) são transientemente transfectados e os receptores são expressos em células HEK293T. Quarenta e oito horas após transfecção, células NPR-B, NPR-C e HEK293T nativas são coletadas, contadas e plaqueadas em uma razão de 1:1 (células NPR-B : células de competição (ou células NPR-C ou HEK293T nativas)) em placas de 12 poços ou 96 poços. Vinte e quatro horas após plaqueamento, as células são processadas para o ensaio de estimulação de NPR-B/cGMP descrito no Exemplo 4. Se presente, o receptor de excreção natriurético, NPR-C, é esperado se ligar e internalizar CNP, desta maneira reduzindo a concentração de CNP geral disponível para sinalização através de NPR-B, resultando em produção de cGMP diminuída e uma mudança na curva de dose-resposta para a direita. Uma mudança para a direita na curva de dose-respsota foi verificada para wtCNP22. Variantes de CNP tendo afinidade reduzida para NPR-C não são esperadas induzir uma mudança, ou são esperadas induzir uma mudança pequena, na curva de dose-resposta para a direita. Este ensaio de competição de sinalização é similar àquele previamente descrito por Cunningham (Patente U.S. 5.846.932; B. Cunningham, *EMBO J.* 13(11): 2508-2515 (1994); H. Jin e outros, *J. Clin. Invest*. 98(4): 969-976 (1996)).

[0880] A atividade de estimulação de cGMP de wtCNP-22, Pro-Gly-wtCNP37 e ANP através de NPR-B e NPR-A e sua seletividade para NPR-B vs. NPR-C e para NPR-A vs. NPR-C foram avaliadas em ensaios de competição de sinalização. NPR-A, NPR-B e NPR-C individualmente foram transientemente transfectadas em células HEK293T. Trinta horas após a transfecção, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços: (A) 20.000 células NPR-B + 20.000 células falso-

transfectadas; (B) 20.000 células NPR-B + 20.000 células NPR-Cs; (C) 20.000 células NPR-A + 20.000 células falso-transfectadas; e (D) 20.000 células NPR-A + 20.000 células NPR-C. Vinte e quatro horas após plaqueamento, o meio de cultura foi removido e substituído com meio livre de soro:PBS (1:1) + 0,75 uM de IBMX por 15 minutos. Para sinalização de cGMP através de NPR-B, séries de dose de ANP, CNP-22 e Pro-Gly-CNP37 foram adicionadas e incubadas a 37°C por 12 minutos antes do ensaio ter sido parado pela lise de célula. Para sinalização de cGMP através de NPR-A, uma série de dose para CNP-22 e Pro-Gly-CNP37 foi incubada a 37°C por 12 minutos, enquanto série de dose para ANP foi incubada a 37°C por 6 minutos (devido ao fato do NPR-A parecer ser uma guanilil ciclase "mais rápida" do que NPR-B, o tempo de incubação para ANP foi mais curto a fim de não maximizar (usar todo o GTP celular) muito cedo quando sinalizando com ANP). As figuras **24A** e **B** mostram que CNP-22 e Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") estimularam a produção de cGMP através de NPR-B com curvas de dose-resposta similares e para um grau muito maior do que através de NPR-A e exibiram um perfil similar para seletividade para NPR-B vs. NPR-C nos ensaios de competição de sinalização.

Determinação de Afinidades de Ligação ($K_i$) para NPR-A, NPR-B e NPR-C

[0881] As afinidades de ligação ($K_i$) de variantes de CNP para NPR-A, NPR-B e NPR-C são determinadas em um ensaio de ligação de competição heterólogo (Patente U.S. Nº 5.846.932; B. Cunningham, *EMBO J.* 13(11): 2508-2515 (1994); H. Jin e outros, *J. Clin. Invest*. 98(4): 969-976 (1996)). Membranas de células HEK293, ou outra linhagem de célula adequadamente transfectável (por exemplo, células HeLa), expressando NPR-A, NPR-B ou NPR-C humanas são preparadas para ensaios de ligação de ligante radiomarcado. Preparações de membrana são diluídas em um tampão apropriado e concentrações

variáveis de wtCNP22 ou variante de CNP (competidor) são adicionadas com wtCNP22 marcado com $I^{125}$ (Bachem). As amostras são incubadas para temperatura ambiente para permitir equilíbrio de ligante/receptor e peptídeo ligado é separado do peptídeo livre através de filtragem em membranas de filtro PVDF. Os filtros são lavados ante da adição de cintilante e contagem por um contador de cintilação. Ligação é medida em duplicata para cada concentração de peptídeo competidor. Afinidade de variante de CNP ($K_i$, constante de dissociação de equilíbrio) e $B_{max}$ (número de receptor) são calculados através de análise de regressão não linear e/ou a equação Cheng-Prusoff.

[0882] Variantes de CNP exibindo afinidade reduzida para NPR-C são esperadas ter susceptibilidade reduzida à excreção por NPR-C e então uma meia-vida no plasma ou soro mais longa. Meia-vida no soro maior das variantes de CNP em circulação aumentaria a disponibilidade das variantes para atividade terapêutica.

Exemplo 6

Efeito de Variantes de CNP sobre o Crescimento de Células de Condrossarcoma de Rato (RCS) e Produção de cGMP em Células RCS

[0883] Para avaliar a habilidade de variantes de CNP em estimular crescimento de osso, displasia esquelética é simulada em cultura celular através de tratamento de células de condrossarcoma de rato (RCS) com fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF-2), que ativa receptor 3 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR-3) e induz parada de crescimento (Krejci e outros, *J. Cell Sci.*, 118(21):5089-5100 (2005)).

[0884] Parâmetros de tratamento de CNP ótimos são determinados através da variação da concentração de CNP (0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 uM) e duração e intervalo do tratamento (contínuo: 2,5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h uma vez por dia; 2,5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, e 4 h duas vezes por dia). Após 72 horas, as células são contadas usando um contador de célula automático e a quantidade de matriz

extracelular é estimada usando tingimento com azul alciano.

[0885] Células RCS são então tratadas com uma variante de CNP usando as condições ótimas determinadas dos experimentos de crescimento com wtCNP22. A concentração de cGMP é medida através de ELISA competitivo para células RCS não tratadas, células RCS tratadas com CNP e células RCS tratadas com a variante de CNP. Crescimento de célula e síntese de matriz resultantes de tratamento com a variante de CNP são também monitorados e comparados com aqueles resultantes de tratamento com CNP.

[0886] Para avaliar o efeito de variantes de CNP em um sistema de cultura de célula humano, condrócitos humanos rediferenciados primários em contas alinhadas são tratados com wtCNP22 e variantes de CNP e a concentração de cGMP é determinada através de ELISA competitivo como uma medida de sinalização de CNP eficaz.

[0887] Os métodos descritos aqui podem ser empregados para avaliar a habilidade de variantes de CNP em estimular produção de cGMP em e crescimento de células de condrossarcoma de rato *in vitro*.

Exemplo 7

Estudo de Dose Resposta em Células de Condrossarcoma de Rato

[0888] O receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 (FGFR-3) receptor tirosina cinase, um regulador negativo de crescimento de condrócito, está constinuamente ativo em indivíduos com acondroplasia. Estimulação do receptor FGFR-3 com FGF-2 causa parada de crescimento através de ativação prolongada de Erk MAPK e causa síntese de matriz menor e perda de matriz, bem como uma mudança em formato de célula. Exposição contínua de células de condrossarcoma de rato (RCS) a fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2) estimula acondroplasia em cultura celular através da ativação de FGFR-3 e indução de parada de crescimento (Krejci e outros, *J. Cell Sci.*, 118(21): 5089-5100 (2005)). Para determinar a dose de variante

de CNP e a frequência de dosagem que estimula crescimento suficiente de células de osso, um estudo de dose-resposta foi realizado usando o ensaio de célula RCS conforme descrito no Exemplo 6.

[0889] As células RCS foram semeadas a 10 x $10^3$ células por poço em placas de 24 poços, cultivadas por 24 h, tratadas por 72 h e então contadas. As células RCS foram continuamente expostas a FGF-2 (5 ng/mL) para estimular um FGFR-3 constitutivamente ativo, que induziu parada de crescimento celular (vide barra Nº 5 na **figura 25**). CNP22 do tipo selvagem (0,2 uM) foi culturado continuamente (72 h), 1 h diariamente ou 2 h diariamente. Todos os estimulantes foram mudados diariamente. Exposição contínua de células RCS a 0,2 uM de CNP22 na presença de 5,0 ng/ml de FGF-2 reverteu parcialmente parada de crescimento induzida por FGF2, levando ao crescimento de aproximadamente 200 x $10^3$ células por poço (barra Nº 6 na figura 25), comparado com aproximadamente 100 x $10^3$ células por poço na ausência de NCP22 (barra Nº 5 na figura 25).

[0890] Ambas a exposição por 1 h a CNP22 (0,2 uM) uma vez por dia e a exposição de 2 h a CNP22 (0,2 uM) uma vez por dia atingiram cerca de 84% do efeito de exposição a CNP22 contínua (0,2 uM) sobre crescimento de condrócito (barras Nos. 7 e 8 na figura 25). Esses resultados demonstram que exposição contínua de condrócitos de parada de crescimento a CNP22 não é requerida para reversão de parada de crescimento celular. Ainda, estudos de dose-resposta demonstraram que doses menores de CNP22 são capazes de reverter parada de crescimento (**figura 26A**).

[0891] Ainda, análises histológica e morfológica de célula da matriz extracelular mostraram que tratamento com CNP22 antagonizou perda mediada por FGF2 de matriz extracelular de condrossarcoma e síntese de matriz aumentada. Exposição a FGF-2 diminuiu a síntese de matriz e aumentou a degradação, enquanto adição de CNP22 à

cultura de célula de FGF-2 aumentou a síntese de matriz e inibiu parcialmente FGF-2, conforme avaliado através da incorporação de $^{35}$S-sulfato e $^{3}$H-Pro na, ou subtraída, da matriz (**figuras 27A-D**). Análise de produção de agrecano e fibronectina (mRNA e proteína) em células RCS cultivada s com FGF-2 e CNP22 mostra que FGF-2 diminuiu o nível de agrecano e aumentou o nível de fibronectina, que foi inibida pela adição de CNP22 (**figuras 28A-C**). FGF-2 induz e ativa moléculas de processamento de matriz predominantemente através de Erk e adição de CNP22 mostra algum efeito sobre esta ativação.

[0892] Ensaios de alto rendimento adicionais para medição de parada de crescimento, tal como tingimento com violeta cristal, são úteis para medição dos efeitos de CNP22 e suas variantes sobre células RCS.

[0893] Estudos de dose-resposta similares podem ser conduzidos com as variantes de CNP descritas aqui para determinar sua dose eficaz para reversão de parada de crescimento induzido por FGF2 de células RCS.

Exemplo 8A

Estimulação *Ex vivo* de Crescimento de Tíbia e Fêmur de Camundongos com Acondroplasia Leve

[0894] Modelo de cultura de órgão da tíbia de camundongo foi usado para demonstrar a eficácia de CNP22 do tipo selvagem em estimulação de crescimento de osso longitudinal. Tratamento de tíbia do tipo selvagem com CNP22 a $10^{-8}$, $10^{-7}$ ou $10^{-6}$ M por 6 dias aumentou o crescimento longitudinal em 31%, 40% e 42%, respectivamente. Avaliação histológica também mostrou expansão da zona hipertrófica, por exemplo, um aumento no número e no tamanho de condrócitos hipertróficos na placa de crescimento (Agoston e outros, *BMC Dev. Biol*. 7:18 (2007)). Constatações similares foram observadas nas tíbias isoladas de camundongos FGFR3$^{Ach}$ (Yasoda e outros, *Nat. Med*. 10: 80-

86 (2004)).

[0895] Para determinar a eficácia de variantes de CNP na estimulação de crescimento de osso longitudinal, variantes de CNP foram testadas em um modelo de cultura de órgão de camundongo de crescimento de osso endocondral em camundongos do tipo selvagem e camundongos transgênicos tendo uma mutação G380R no gene de FGFR-3 humano (heterozigoto $FGFR3^{wt/Ach}$) que representa um modelo de camundongo de acondroplasia leve. Em suma, a atividade farmacológica de CNP22 do tipo selvagem e variantes de CNP foi comparada em um modelo de cultura de órgão de tíbias de camundongos embriônicos e neonatais, isoladas de filhotes do tipo selvagem e $FGFR3^{wt/Ach}$. Crescimento de osso geral e mudanças histológicas na placa de crescimento foram avaliados. Meio de cultura condicionado é também avaliado quanto a biomarcadores de sinalização intracelular (cGMP), metabolismo de cartilagem (colágeno tipo II, outros colágenos, sulfato de condroitina agrecano), metabolismo ósseo (fosfatase alcalina óssea, osteocalcina, colágeno tipo I [C-telopeptídeo, N-telopeptídeo]) e inflamação (interleucina-1, interleucina-6, interleucina-11).

[0896] Variantes de CNP eficazes são identificadas pela sua habilidade, por exemplo, em estimular produção de cGMP e crescimento de osso conforme medido através do aumento do comprimento do osso longitudinal e expansão das células na zona hipertrófica da placa de crescimento.

Medição de Crescimento de Osso

[0897] A eficácia de wtCNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) em estimulação de crescimento femoral longitudinal foi avaliada no modelo de cultura de órgão de camundongo. Para esses experimentos, fêmures foram isolados de camundongos do tipo selvagem de 2-3 dias e culturados em alphaMEM suplementado com BSA 0,2%, L-glutamina 0,5 mM, 40 unidades de penicili-

na/mL e 40 ug de estreptomicina/mL por 8 dias na presença de veículo, CNP22 ou variantes de CNP. O tratamento começou no dia 0 e foi repetido a cada dois dias em seguida, como o meio foi mudado. Os ossos foram medidos antes do tratamento e a cada dois dias em seguida usando um microscópio de dis*sec*ção equipado com um retículo *eye-piece* de 1 cm. Meio condicionado foi usado para análise de biomarcador. No dia 8 os ossos foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 h, descalcificados em ácido fórmico 5% por 24 h, desidratados e embebidos em parafina. Os ossos foram *sec*cionados a 5 um (mícrons), que foram então desparafinizados, reidratados e tingidos com Alcian Blue por 30 min (pH 2,5; MasterTech). Alcian Blue tinge cartilagem de azul. As seções tingidas foram visualizadas e fotografadas através de microscopia de campo de brilho. A espessura da região hipertrófica da cartilagem da placa de crescimento foi determinada através de análise de imagem.

[0898] A **figura 29** ilustra o efeito de wtCNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº:36) sobre o crescimento longitudinal de fêmures de camundongos do tipo selvagem de 3 dias tratados com os peptídeos CNP a cada dois idas. Os resultados foram normalizados para medições antes do tratamento (dia 0). Os estudos foram realizados em triplicada (veículo) ou quaduplicata (peptídeos CNP). Conforme mostrado na figura 29, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº:36), bem como CNP22, foram eficazes na estimulação de crescimento femoral longitudinal, com a variante de CNP PEGuilada N-terminal sendo a mais eficaz.

[0899] O crescimento de fêmur e tíbia de camundongo do tipo selvagem e $FGFR3^{ach}$ em resposta a CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº:36) foi também avaliado. Cultura de tíbia de camundongo do tipo selvagem ou acrondroplástico (FGFR3ach) mostrou que CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R)

(SEQ ID Nº:36) ambos aumentaram o crescimento longitudinal da tíbia comparado com veículo ou CNP22 (**figuras 30** e **31**). CNP22,CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº:36) também estimularam o crescimento de fêmur de camundongo do tipo selvagem (**figura 32**). Além disso, cada um de CNP22, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº:36) e CNP37 aumentou o crescimento longitudinal de fêmur de camundongo $FGFR^{3ach}$ comparado com veículo (**figura 33**).

[0900] Ainda, distribuição *ex vivo* de CNP37 na placa de crescimento de tíbia de camundongo FGFR3ach foi avaliada. Amostras de osso foram preparadas conforme acima descrito. Seções de parafina foram cortadas e fixadas com calor por 1 h a 60°C. Recuperação de antígeno com hialuronidase 1% a 37°C (30 minutos) foi seguida por bloqueio no soro de 1 hora (Soro de Cabra Normal 10%). Anticorpo para CNP22 (diluição 1:500; Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, Califórnia) foi aplicado da noite para o dia a 4º C. Para imunodetecção, o Vectastin ELITE ABC Kit (Vector, Burlingame, Califórnia) foi usado de acordo com as recomendações do fabricante. Peroxidase ligada específica foi visualizada através de incubação com DAB substrate kit (Vector) e a reação foi desenvolvida por 3 minutos. Lâminas foram então desidratadas e montadas e fotografadas usando um microscópio de campo de brilho. Tingimento de CNP na placa de crescimento de tíbia de camundongo $FGFR3^{ach}$ mostrou que imunorreatividade de CNP foi aumentada nas regiões de condrócitos articulares e hipertróficos (**figura 34**), indicando que CNP37 foi aplicado aos condrócitos.

[0901] Em adição à distribuição de variantes de CNP na placa de crescimento de osso, os efeitos *ex vivo* de CNP37, CNP22 e veículo sobre células na placa de crescimento de $FGFR3^{ach}$ e do tipo selvagem, por exemplo, tamanho de célula hipertrófica e celularidade de zona de proliferação, foram também avaliados. Amostras de osso foram preparadas, incluindo tingimento com Alcian Blue, conforme acima

descrito. Imagens da placa de crescimento proximal inteira foram obtidas em ampliação de 4x. A placa de crescimento é dividida em três zonas, começando da lateral epifiseal de cartilagem: a zona de descanso (condrócitos pequenos individuais), zona de proliferação (colunas de condrócitos empilhadas paralelas ao eixo longo do osso) e zona hipertrófica (condrócitos grandes e septo fino entre os condrócitos). Nessas regiões foram feitas medições pelo *software* ImageJ, incluindo o número de condrócitos de proliferação por coluna e a densidade de condrócitos hipertróficos. Um quadrado de teste (4x4 $mm^2$) em cinco regiões diferentes da zona hipertrófica foi usado para determinar a densidade de condrócitos hipertróficos. O tamanho da célula de condrócitos hipertróficos foi calculado por 1 sobre densidade de célula determinada. Celularidade de colunas de proliferação foi aumentada por CNP37 e CNP22 em ambos os camundongos do tipo selvagem e $FGFR3^{ach}$ (figuras **35B** e **C**). Hipertrofia de condrócito em camundongos FGFR3ach foi também aumentada como um resultado de cultura com CNP22 ou CNP37 (**figuras 36B** e **C**).

[0902] Estudos *ex vivo* de culturas de ossos de camundongo indicaram que CNP37 era aplicado à placa de crescimento e era capaz de aumentar a celularidade e a hipertrofia de condrócito, que estão associadas com expansão de placa de crescimento e crescimento de osso longitudinal. Para avaliar a biodistribuição de CNP37 em placa de crescimento de osso *in vivo* e os efeitos *in vivo* de CNP37 sobre a placa de crescimento (incluindo espessura da placa de crescimento total, espessura da zona hipertrófica e celularidade de zona de proliferação), amostras de osso foram obtidas de camundongos $FGFR^{3ach}$ tratados com veículo ou CNP37 conforme acima descrito. Para estudos de biodistribuição e efeitos *in vivo*, as tíbias foram fixadas e armazenadas em etanol 70%. Para imunoistoquímica, as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico 5% por 2 dias, desidratadas e embebidas em

parafina. Os ossos foram *sec*ionados em 5 um (mícrons), que foram então desparafinizados, reidratados e usados para imunoistoquímica de CNP conforme acima descrito. Para análise de imagem celular, os ossos foram *sec*cionados a 5 µm (mícrons) e então desparafinizados, reidratados e tingidos com Alcian Blue por 30 minutos (pH 2,5; MasterTech) e Hematoxilina & Eosina por 30 segundos. As seções tingidas foram visualizadas e fotografadas através de microscopia de campo de brilho. As espessuras da placa de crescimento e das zonas de proliferação e hipertróficas foram medidas usando *software* ImageJ.

[0903] Estudos de biodistribuição *in vivo* demonstraram que, similar aos estudos *ex vivo*, a imunorreatividade de CNP foi aumentada na região de condrócitos articulares e hipertróficos na placa de crescimento da tíbia de camundongos $FGFR^{3ach}$ tratados com CNP37, indicando que CNP37 foi aplicado *in vivo* à placa de crescimento de tíbia de camundongo $FGFR^{3ach}$ (**figura 37**). Ainda, tratamento com CNP37 aumentou significantemente a espessura da placa de crescimento total, espessura da placa de proliferação e espessura da zona hipertrófica de tíbia de camundongo FGFR*3ach in vivo* (**figuras 38A-C**).

[0904] Esses resultados demonstram que variantes de CNP da invenção penetram na placa de crescimento de animais do tipo selvagem e acondroplásticos, aumenta o número e o tamanho de condrócitos, aumenta a espessura da zona de proliferação e da zona hipertrófica da placa de crescimento e aumenta o crescimento de osso longitudinal em animais do tipo selvagem e acondroplásticos tratados. Desta maneira, as variantes de CNP são úteis para estimulação de crescimento de osso em indivíduos acondroplásticos.

Medição de Biomarcadores

[0905] Em adição à medição de crescimento de osso em reposta a variantes de CNP, ensaio dos níveis de biomarcadores para formação e crescimento de cartilagem e osso induzidas em resposta a variantes

de CNP são úteis para avaliação do efeito de variantes de CNP sobre crescimento de osso.

[0906] Fêmures e tíbias foram isolados de camundongos do tipo selvagem e FGFR3ach conforme acima descrito. Os ossos foram culturados com CNP22 ou uma variante do mesmo por oito dias com a substituição de meio a cada dois dias. No oitavo dia, meio foi coletado e analisado quanto a biomarcadores cGMP (guanosina 3' cíclica, monofosfato 5'cíclico) e fragmentos de colágeno tipo II clivado, um marcador específico de cartilagem para mudança de cartilagem. Ambos os marcadores foram medidos usando ensaios imunoabsorventes ligados à enzima comercialmente disponíveis (ELISA) para cGMP (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, Michigan) e colágeno tipo II clivado (Cartilaps) (Immunodiagnostic Systems, Fountain Hills, Arizona), seguindo o protocolo do fabricante.

[0907] Os níveis de fragmentos de cGMP e colágeno tipo II foram medidos de extratos de cultura de célula após exposição a CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº: 36). As **figuras 39-42** mostram um aumento grande ($p<0,01$) nos níveis de cGMP nos meios após exposição de fêmures e tíbias de camundongo do tipo selvagem e FGFR3ach explantados a CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36). Ainda, exposição de fêmures de a camundongo do tipo selvagem e FGFR3ach a CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) aumentou os níveis de colágeno tipo II clivado, com os fêmures de camundongos FGFR3ach tratados mostrando níveis significantemente aumentados ($p<0,05$) de fragmentos de colágeno tipo II (**figura 43**). Níveis elevados de fragmentos de colágeno tipo II indicam uma mudança da matriz de colágeno, e mudança da cartilagem tipicamente precede nova formação de osso em ossos em crescimento.

Exemplo 8B

Estimulação *ex vivo* de Crescimento de Fêmur de Camundongos com Acondroplasia severa

[0908] O efeito de uma variante de CNP sobre o crescimento de ossos de camundongos com acondroplasia severa foi avaliado *ex vivo*. Foram usados no estudo camundongos transgênicos expressando um gene do FGFR-3 humano tendo uma mutação em Y367C ($FGFR3^{Y367C}$) [S. Pannier et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1792(2): 140-147 (2009)], que representa um modelo de camundongo de acondroplasia severa. Os fêmures foram isolados no dia embriônico 16,5 e culturados por 6 dias na presença de 1 uM de Pro-Gly-CNP37. Os comprimentos do osso foram medidos no Dia 1 e no Dia 7. Os ossos foram então embebidos em parafinas, *sec*cionados e tingidos com hematoxina e eosina para avaliar mudanças histológicas e morfologia celular. Tratamento de explantes de osso isolados de camundongos FGFRY367C com Pro-Gly-CNP37 ("ProCNP38") resultou em aumento em crescimento e expansão de osso na placa de crescimento (**figura 44**). Fêmures de camundongos FGFR3Y367C tratados com veículo por 6 dias mostraram uma deficiência de 18% em comprimento de crescimento comparado com fêmures do tipo selvagem tratados com veículo. Tratamento de fêmures de camundongos FGFR367Y com 1 uM de Pro-Gly-CNP37 por 6 dias reduziu a deficiência de crescimento para apenas 11%, isto é, reduziu o defeito em crescimento em torno de 40%.

Exemplo 9

Estabilidade no Soro/Plasma de Variantes de CNP *In vitro*

[0909] Em preparação para estudos farmacocinéticos (PK), a estabilidade de variantes de CNP em soro e/ou plasma é avaliada.

[0910] Em suma, o analito é isolado através da remoção de proteínas do soro ou plasma ou através de preparação de ácido trifluoracético 2% ou precipitação de soro:acetontirila 1:3. A mistura de precipita-

ção é vortexada a 14.000 rpm por cinco minutos, e uma porção do sobrenadante é removida e diluída com água antes da transferência para um frasco autoamostrador silanizado para análise. Extratos do soro são então analisados através de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) com espectrometria de massa de ionização por eletropulverizaçao (ESI-MS). Uma massa simples (m/z), mostrada ser específica para a variante de CNP, é monitorada para propósitos de quantificação.

[0911] Inicialmente, a estabilidade analítica e a recuperação são determinadas. Parâmetros analíticos (RP-HPLC e ESI-MS) são otimizados através da análise de padrões de matriz (extratos de soro fortificados com analito pós-precipitação). Após otimização, recuperação analítica é determinada salpicando amostras de soro em concentrações conhecidas e comparação da resposta do analito àquela dos padrões de matriz preparados em concentrações similares. A estabilidade do analito em extratos de soro é também determinada para assegurar que quaisquer perdas significantes ocorram após precipitação do soro e antes da análise real. Para testar o efeito de congelamento sobre a estabilidade do soro, um estudo de congelamento/descongelamento de dois ciclos é também realizado. Neste estudo uma amostra de soro é salpicada com variante de CNP e analisada antes do congelamento da noite para o dia a -20°C. A amostra é então descongelada em temperatura ambiente e novamente analisada. O processo é repetido para um segundo ciclo de congelamento/descongelamento.

[0912] A estabilidade no soro de variante de CNP é determinada salpicando amostras de soro/plasma com variantes de CNP em uma concentração de 10 ug/mL. A amostra é posta em um banho de água a 37°C por um período de três horas. Após intervalos de 30 min alíquotas em duplicata de soro são removidas e analisadas. Se perdas

rápidas de analito forem evidentes (>50% em 30 minutos), o estudo pode ser repetido com pontos de tempo de 10 minutos.

[0913] Em um método exemplar para determinação da estabilidade da variante de CNP em plasma de murino, uma mistura de variante de CNP (10 uL de uma solução de estoque em cerca de 2,5-5,0 mg/mL), plasma de murino heparinizado (50 uL, Bioreclamation, CD-1 Lith Hep 62231) e NaCl 5 mM (10 uL) é incubada a 37°C e CO2 50% por 0-5 h, e então extinta com coquetel inibidor de protease 10x (15 uL, Sigma P2714). Para extração, 150 uL de MeOH/FA 0,1% são adicionados a 85 uL da mistura de reação e a mistura resultante é vortexada por 1 min e então centrifugada a 15°C por 15 min. 75 uL do sobrenadante são misturados a 300 uL de FA aquoso 0,1%. Uma porção pequena da mistura resultante é submetida à análise através de LC/MS.

Exemplo 10

Farmacocinética e Produção de cGMP em Ratos e Camundongos

[0914] Os estudos foram conduzidos em ratos normais para avaliar o perfil farmacocinético (PK) de CNP22 em certas variantes de CNP e os cursos de tempo de concentração de cGMP no plasma após administração intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c.) dos peptídeos CNP. A imunorreatividade de CNP no plasma foi determinada usando um radioimunoensaio competitivo (RIA) com um anticorpo policlonal de coelho anti-CNP. Concentração de cGMP no plasma foi determinada através de RIA usando um estojo comercialmente disponível (YAMASA cyclic GMP Assay kit, YAMASA Corporation).

[0915] Ratos machos normais, 7-8 semanas de vida, foram usados. CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) do tipo selvagem recombinantes foram avaliados. Uma dosagem de 20 nmol/kg d cada peptídeo CNP como uma solução em manitol 5% foi intravenosamente injetada uma vez na cauda, ou uma dosagem de 50

nmol/kg de cada peptídeo CNP como uma solução em 0,03 mol/L de solução tampão de ácido acético, pH 4,0, contendo álcool benzílico 1% (p/v) e sacarose 10% (p/v), foi subcutaneamente injetada uma vez no dorso.

[0916] Imunorreatividade de CNP no plasma foi determinada através de RIA competitivo usando anticorpo policlonal de coelho anti-CNP. Amostras padrão e QC foram preparadas. Cinquenta uL das amostras padrão, QC e de ensaio foram adicionados, respectivamente, aos tubos de teste contendo 50 uL de tampão RIA. Anticorpo policlonal de coelho anti-CNP diluído (100 uL) foi adicionado aos tubos. Todos os tubos foram mantidos a 4°C da noite para o dia. Solução de $^{125}$I-[Tyr$^{0}$]-CNP22 (100 uL) e solução de IgG de Coelho (100 uL) foram adicionadas e deixadas aproximadamente a 4°C da noite para o dia. Um mililitro de soro de cabra IgG anticoelho contendo polietileno glicol 10% foi adicionado, vortexado e deixado em aproximadamente 4°C por pelo menos uma hora, e então a fração isolada foi precipitada através de centrifugação. Após aspiração do sobrenadante, a quantidade de radiação (linha gama) no sedimento foi medida através de um contador gama. Cada amostra foi medida em duplicata e a média foi adotada como o valor determinado.

[0917] As concentrações de cGMP no plasma na amostra a 5, 30, 60 e 90 minutos após dosagem i.v., ou a 5, 30, 60, 120 e 180 minutos após dosagem s.c., foram determinadas através de RIA competitivo usando anticorpo monoclonal anti-cGMP. Amostras padrão foram preparadas. 100 uL das amostras de ensaio (soluções padrão para a curva de calibragem ou as amostras de plasma diluídas para determinação de cGMP) foram transferidos para os tubos de teste. Então 100 uL de solução de anticorpo monoclonal anti-cGMP e 100 uL de solução de succinil cGMP metil éster de tirosina marcada com $^{125}$I foram adicionados aos tubos, respectivamente. Todos os tubos foram mantidos a

4°C da noite para o dia. Após a adição de 500 uL de solução de carvão dextrano, os tubos foram vortexados e então postos em gelo por 10 minutos. A mistura de reação foi centrifugada e 500 uL do sobrenadante foram transferidos de cada amostra para um tubo de teste novo. A quantidade de radiação (linha gama) no sobrenadante foi medida através do contador gama. Cada amostra foi medida em duplicata e a média foi adotada como o valor determinado.

[0918] A imunorreatividade de CNP no plasma foi empregada para análise farmacocinética (PK). Análise PK foi realizada usando WINNONLIN® Professional (Pharsight Corporation). Os perfis de PK de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) após administração i.v. foram calculados usando parâmetros de PK tal como concentração a 0 hora (C0: extrapolação, pmol/mL), excreção do corpo total ($CL_{tot}$: mL/min/kg), volume de distribuição no estado uniforme ($V_{dss}$: mL/kg), área sob a curva concentração-tempo no plasma (AUC: pmol·min/mL), tempo de residência médio (MRT: min) e meia-vida ($T_{1/2}$: min). Os perfis de pH dos peptídeos CNP após administração s.c. foram calculados usando os parâmetros PK como concentração máxima no plasma ($C_{max}$: pmol/mL), ponto para atingir $C_{max}$ ($T_{max}$: min), área sob a curva concentração-tempo no plasma (AUC: pmol·min/mL), tempo de residência médio (MRT: min) e meia-vida ($T_{1/2}$: min).

[0919] Em experimentos de recuperação de salpicado no plasma, o RIA detectou CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) similarmente (dados não mostrados).

[0920] Procedimentos similares àqueles descritos acima são empregados para estudar em camundongos o perfil PK de CNP22 e suas variantes e sua habilidade em estimular produção de cGMP.

[0921] Os perfis de PK de CNP22, CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) após administração i.v. em três ratos são administrados na **figura 45**. Conforme mostrado pela **figura 45**,

CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinham uma meia-vida muito mais longa e uma biodisponibilidade muito maior do que CNP22. A meia-vida, $T_{1/2}$ (min), foi 1,42 (± 0,45) para CNP22, 22,3 (± 1,5) para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) e 49,5 (± 28,0) para CNP37, A área sob a curva, AUC (pmol·min/mL), foi 320 (± 54) para CNP22, 1559 (± 568) para CNP37, e 2084 (± 424) para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36).

[0922] Os perfis de PK dos três peptídeos de CNP após administração s.c. em três ratos são mostrados na **figura 46**. Comparado com CNP22, PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinham uma meia-vida muito maior (78,1 min (± 16,4) vs. 10,0 (± 5,0)) e uma biodisponibilidade muito maior (60% (± 6%) vs. 19% (± 9%)).

[0923] Os cursos de tempo de concentração de cGMP no plasma após administração i.v. dos três peptídeos CNP em três ratos são mostrados na **figura 47**. A figura 47 demonstra claramente que administração i.v. de CNP37 e CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) resultou em níveis no plasma muito maiores de cGMP em 30, 60 e 90 minutos do que administração i.v. de CNP22.

[0924] Os perfis de tempo de concentrações de cGMP no plasma após administração s.c. dos três peptídeos de CNP em três ratos são mostrados na **figura 48**. Administração subcutânea de PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) e CNP37 também resultou em concentração de cGMP no plasma substancialmente maiores do que administração s.c. de CNP22, com a diferença relativa a CNP22 aumentando com o tempo para PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36), mas diminuindo com o tempo para CNP37.

[0925] Os estudos com rato indicam que comparado com wtCNP22, as variantes de CNP CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) tinham uma meia-vida substancialmente mais longa *in vivo*, tinham uma biodisponibilidade substancialmente

maior *in vivo* e estimularam níveis substancialmente maiores de produção de cGMP *in vivo* para um período de tempo prolongado. A resistência de CNP37 e PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) à degradação por NEP refere-se a uma meia-vida no plasma mais longa *in vivo*, que por sua vez relaciona-se com sinalização de NPR-B/cGMP prolongada *in vivo*. Esses resultados mostram que comparado com CNP22, as variantes de CNP da invenção, administradas através de injeção i.v. ou s.c. (por exemplo, uma vez por dia), podem ser mais eficazes em tratamento de condições ou distúrbios responsivos a CNP, tais como distúrbios relacionados a osso e distúrbios de músculo liso vasculares.

Exemplo 11

Estudo Farmacocinético em Camundongos

[0926] Para determinar as variantes de CNP tendo resistência a NEP aumentada, para estudo de eficácia em camundongos $FGFR^{3ach}$ (vide Exemplo 13), um estudo farmacocinético (PK) é realizado, o qual compara as propriedades farmacocinéticas de variantes de CNP com CNP22 do tipo selvagem. O camundongo FGFR3ach é um modelo de camundongo mutante de acondroplasia leve, contendo um transgene único em uma base de camundongos FVB.

[0927] CNP22 do tipo selvagem ou sua variante é administrado como uma dose intravenosa única (i.v.) em camundongos FVB do tipo selvagem de 6 semanas de vida. Estudos PK exemplares foram conduzidos usando wtCNP22. Camundongos FVB/N de seis semanas foram intravenosamente administrados wtCNP22 em uma dose única a 100 nmol/kg. Os níveis no plasma médios de CNP22 foram calculados, e a meia-vida estimada de CNP22 foi determinada ser de a partir de cerca de 0,76 min a 1,03 min.

[0928] Variantes de CNP mostrando resistência maior à degradação por NEP são esperadas exibir concentrações no soro aumentadas

com o tempo e uma meia-vida maior *in vivo*.

Exemplo 12

Eficácia de Variantes de CNP em Camundongos do Tipo Selvagem

[0929] Os efeitos *in vivo* de variantes de CNP sobre o crescimento de osso foram avaliados em camundongos do tipo selvagem. Camundongos machos do tipo selvagem FVB de três semanas de vida receberam injeção subcutânea (s.c.) diariamente ou de veículo, G-CNP37 (200 nmol/kg) ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36) (200 nmol/kg) por 5 semanas. O peso do corpo foi medido pelo menos uma vez por semana. O comprimento da cauda foi medido pelo menos uma vez por dia usando leituras de calibre digital e o comprimento do corpo (comprimento naso-anal), comprimento do osso (tíbia, fêmur, ulna e húmero), comprimento do crânio (segmentos craniados anterior a posterior) e comprimento das vértebras lombares 5 (LV5) foram medidos após 5 semanas de tratamento usando um calibre. Raios X foram feitos na linha de base e após 5 semanas de tratamento.

[0930] Cinco semanas de tratamento de camundongos do tipo selvagem com G-CNP37 resultou em ganho de peso corporal significante, com peso do corpo aumentado sendo observado começando no Dia 9 ($p<0,05$) (**figura 49**). Tratamento com G-CNP37 também resultou em comprimento da cauda significantemente aumentado, começando na segunda semana após tratamento ($p<0,01$) (**figura 50**).

[0931] A **Tabela 10** mostra a mudança percentual em comprimento da cauda, comprimento do corpo (naso-anal), comprimento do crânio (segmentos cranianos anterior a posterior), comprimentos de osso (fêmur,tíbia, húmero e ulna) e comprimento da vértebra lombar 5 (LV5) em camundongos do tipo selvagem injetados s.c. uma vez por dia com 200 nmol/kg ou de G-CNP37 ou PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36) por 5 semanas, com relação a um

valor de 100% para camundongos do tipo selvagem tratados com veículo apenas.

Tabela 10

| | Cauda | Naso-Anal | Anterior para Posterior (Crânio) | Fêmur | Tíbia | Húmero | Ulna | 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

[0932] Tratamento com G-CNP37 resultou em comprimento da cauda, comprimento do corpo (naso-anal), comprimento do crânio, comprimento do osso proximal (fêmur e húmero), comprimento do osso distal (tíbia) e comprimento vertebral (vertebra lombar 5) significantemente aumentados comparado com tratamento com veículo.

[0933] Doses menores de Pro-Gly-CNP37 diariamente dosadas s.c. a 5 nmol/kg, 20 nmol/kg ou 70 nmol/kg por cinco semanas resultou em um aumento dependente da dose em comprimento de cauda, comprimento do corpo (naso-anal) e comprimentos do osso comparado com veículo. A **Tabela 11** mostra a mudança percentual em comprimento da cauda, comprimento do corpo (naso-anal) e comprimentos de osso (fêmur, tíbia, húmero e ulna) em camundongos do tipo selvagem injetados s.c. uma vez por dia com 5 nmol/kg, 20 nmol/kg ou 70 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 por 5 semanas, com relação ao valor de 100% para camundongos do tipo selvagem tratados com veículo apenas.

Tabela 11

| | Cauda | Naso-Anal | Fêmur | Tíbia | Húmero | Ulna |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **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%** |
| **70 nmol/kg** | 113,6%** | 112,5%** | 109,3%** | 105,9%** | 103,6%** | 104,1%** |

**p<0,01, *p<0,05

[0934] Em outro estudo, vários regimes de dosagem de Pro-Gly-

CNP37 foram administrados por nove semanas seguido por uma semana de recuperação. Camundongos FVB do tipo selvagem foram dosados s.c. com:

(1) Veículo diariamente por nove semanas, seguido por uma semana de recuperação;

(2) 20 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 diariamente por uma semana, seguido por três doses por semana por oito semanas e uma semana de recuperação;

(3) 20 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 em semanas alternadas; ou

(4) 5 nol/kg de Pro-Gly-CNP37 diariamente por nove semanas seguido por uma semana de recuperação.

[0935] Crescimento aumentado em comprimento da cauda, comprimento do corpo e comprimentos dos ossos foi observado em todos os grupos de tratamento (Grupos 2, 3 e 4) no final do estudo. A **Tabela 12** mostra a mudança percentual em comprimento da cauda, comprimento do corpo (naso-anal) e comprimentos de osso (fêmur, tíbia, húmero e ulna) em camundongos do tipo selvagem administrados com Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") sob os regimes de dosagem descritos acima, com relação a um valor de 100% para camundongos wt tratados com veículo apenas.

Tabela 12

| | **Pro-CNP38 Total recebido (nmol/kg)** | **Cauda** | **Naso-Anal** | **Fêmur** | **Tíbia** | **Húmero** | **Ulna** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Grupo 2** | 620 | 104,8%** | 106,0%** | 105,3%** | 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%** | 105,1%** | 107,3%** | 102,7%** | 102,3%** | 103,6%** |

**p<0,01, *p<0,05

[0936] Embora todos os regimes de dosagem de Pro-Gly-CNP37 tenham aumentado os parâmetros de crescimento axial e apendicular medidos, dosagem diária de Pro-Gly-CNP37 promoveu crescimento

apendicular (fêmur, tíbia, húmero e ulna) em um nível de dose total menor (Grupo 4) comparado com regimes com dosagem menos frequente (Grupos 2 e 3).

Exemplo 13

Eficácia em Modelo de Camundongo de Acondroplasia Suave

[0937] A eficácia de variantes de CNP em aumento de crescimento e correção de acondroplasia foi testada em um modelo de camundongo de acondroplasia suave, usando uma linhagem de camundongos transgênicos expressando um gene FGFR-3 humano tendo uma mutação G380R (GFGR3ach) (Wang e outros., *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 96(8): 4455–4460 (1999); Naski e outros, *Development USA*, 125: 4977-4988 (1998); Patentes U.S. Nos 6.265.632 e 6.136.040).

[0938] Com 3 semanas de vida, camundongos $FGFR^{3ach}$ e seus filhotes do tipo selvagem foram anestesiados para ter imagens de raio X de corpo inteiro lateral obtidas por Faxitron e aleatorizados pelo peso do corpo nos grupos de tratamento que seguem (n=8/grupo): (1) tipo selvagem/veículo, (2) $FGFR^{3ach}$/veículo, (3) FGFR3ach/CNP37 e (4) FGFR3ach/PEO24-GANRR-CNP22 (SEQ ID Nº:36). Os camundongos receberam apenas administração subcutânea (s.c.) diária de artigo de teste designado (veículo ou 200 nmol/kg de variantes de CNP) por 5 semanas. Grupos satélite (n=3) foram usados para confirmar a exposição de cada artigo de teste seguindo uma administração subcutânea única no Dia 1. Camundongos FVB machos do tipo selvagem que receberam injeção s.c. diariamente de veículo por 5 semanas foram usados como um controle para crescimento normal.

[0939] Medições de raio X na linha de base e no final do estudo foram realizadas para determinar mudança no comprimento da cabeça, área do crânio e do meato auditivo externo (EAM, o canal do ouvido que vai do ouvido externo para o ouvido médio). O peso do corpo e o comprimento da causa foram medidos pelo menos uma vez por se-

mana, usando um compasso de calibre digital para medir o comprimento da cauda e comprimento do corpo (naso-anal) foi medido após 5 semanas de tratamento. Os comprimentos do osso (tíbia, fêmur, ulna e húmero) foram medidos usando um compasso de calibre digital na necropsia.

[0940] No Dia 37, todos os camundongos foram sacrificados através de anestesia terminal e fotografias do animal todo e imagens de raio X pelo Faxitron foram feitas. Tìbia, fêmur, húmero e ulna esquerdos e direitos foram coletados e medidos usando um compasso de calibre digital. As porções da esquerda de cada osso foram processadas para histologia, e a porções direitas foram congeladas rapidamente para arquivamento. As amostras obtidas dos ossos foram usadas para avaliar os efeitos de variantes de CNP sobre crescimento de osso endocondral.

[0941] Tratamento de camundongos $FGFR^{3ach}$ com CNP37 com injeção s.c. uma vez por dia por 5 semanas resultou em comprimento do corpo (**figura 51**), comprimento da cauda (**figura 52**), comprimentos do osso distal (ulna e tíbia) (**figuras 53A e B**) e comprimentos do osso proximal (húmero e fêmur) (**figuras 54Ae B**) significantemente aumentados. Além disso, tratamento com CNP37 aumentou o comprimento da cabeça (**figura 56**), área do meato auditivo externo (**figura 57**) e comprimento da espinha (**figura 58**) através da extensão dos corpos vertebrais. Adicionalmente, tratamento com CNP37 corrigiu rizomelia (desproporção do comprimento dos membros proximais) de camundongos FGFR3ach, isto é, restaurou o crescimento proporcional de ossos proximais, conforme avaliado através da razão de fêmur:tíbia (**figura 55**). A Tabela 13 sumariza a mudança percentual em comprimento da cauda, comprimento do corpo (naso-anal) e comprimentos do osso (fêmur, tíbia, húmero e ulna) em camundongos FGFR3ach injetados s.c. uma vez por dia com 200 nmol/kg ou de CNP37 ou

PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº: 36) por 5 semanas, com relação ao valor de 100% para camundongos FGFR3ach tratados com veículo apenas.

Tabela 13

| | **Cauda** | **Naso-Anal** | **Fêmur** | **Tíbia** | **Húmero** | **Ulna** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **CNP37** | 115%** | 109%** | 112%** | 107%** | 105%* | 106%** |
| **CNP27-PEO24** | 100% | 99% | 100% | 102% | 100% | 101% |

**p<0,01, *p<0,05

[0942] Os resultados desses estudos mostram que CNP37 pode estimular crescimento de ossos espinhal e longo, ajuda a corrigir rizomelia preferivelmente aumentando o comprimento do fêmur sobre a tíbia e ajuda a restaurar as proporções craniofaciais em camundongos FGFR3ach. Esses resultados indicam que CNP37 e potencialmente outras variantes de CNP podem ser eficazes na correção dos sintomas de acondroplasia e tratamento de indivíduos tendo defeitos em crescimento de osso ou com necessidade de crescimento de osso aumentado.

Exemplo 14

Medição de Biomarcadores e Avaliação de Imunogenicidade em Camundongos do Tipo Selvagem e Acondroplásticos

Medição de biomarcadores após administração de CNP

[0943] Os níveis de biomarcadores de crescimento de osso foram medidos em camundongos do tipo selvagem e acrondroplásticos (FGFR3ach).

[0944] Camundongos FGFR3ach FVB transgênicos (um modelo de camundongo de acondroplasia suave) foram tratados diariamente por 5 semanas através de injeção subcutânea ou através de veículo (ácido acético 30 mM/tampão de acetato, álcool benzílico 1%, sacarose 10%, pH 4,0) CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº: 36) a 200 nmol/kg para cada composto CNP, conforme acima descrito. Plasma e soro foram coletados durante

o estudo. Plasma coletado foi armazenado com inibidor de protease 10x a -80°C até análise. Níveis de cGMP foram medidos 15 minutos pós-injeção no Dia 36 de tubos de coleta de plasma K2-EDTA. Fragmentos de colágeno tipo II clivado (biomarcadores associados à cartilagem), osteocalcina (biomarcador associado a osso) e IgG (relacionado-se à imunogenicidade) foram medidos a partir do soro de sangria terminal no final do estudo (Dia 37). cGMP foi medido usando um estojo ELISA comercialmente disponível kit (Cayman Chemical Co., No Cat.. 581021.1), colágeno tipo II clivado (Cartilaps) foi medido usando um estojo comercialmente disponível da Immunodiagnostic Systems (Cat. Nº 3CAL4000), e osteocalcina foi medida usando um estojo comercialmente disponível da Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, Massachusetts).

[0945] A **figura 59** mostra um aumento em níveis no plasma de cGMP em camundongos FGFR3ach tratados com CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) comparado com veículo. As **figuras 60** e **61** mostram que administração de CNP37 resultou na elevação maior de níveis no soro de colágeno tipo II e osteocalcina. Esses resultados indicam que administração dos peptídeos CNP, em particular CNP37, a camundongos FGFR3ach levou a níveis aumentados de marcadores de crescimento de osso, sugerindo formação e crescimento de osso aumentados em camundongos FGFR3ach tratados com peptídeo CNP.

[0946] Para avaliação de biomarcadores em camundongos do tipo selvagem, camundongos FVB do tipo selvagem foram tratados por 5 semanas através de injeção subcutânea ou com veículo (tampão de ácido acético 30 mM/acetato; álcool benzílico 1%, sacarose 10%, pH 4,0), 200 nmol/kg de G-CNP370, 200 nmol/kg de PEO12-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO12") (SEQ ID Nº: 36) ou 20 nmol/kg ou 70 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37. Plasma e soro foram coletados durante o

estudo. Plasma coletado foi armazenado com inibidor de protease 10x a -80°C até análise. Os níveis de cGMP foram medidos 15 minutos pós-injeção no Dia 36 de tubos de coleta de plasma K2-EDTA. Os níveis de colágeno tipo II clivado, fosfatase alcalina específica de osso e IgG (relacionando-se à imunogenicidade) foram medidos de soro de sangria terminal no final do estudo (Dia 37). cGMP e colágeno tipo II clivado (Cartilaps) foram medidos conforme acima descrito. Fosfatase alcalina específica de osso foi medida usando um estojo comercialmente disponível (Cusabio, No.Cat. CSB-E11914m).

[0947] Administração de G-CNP37 aumentou significantemente ($p<0,05$) o nível de cGMP (**figura 62**) e particularmente o nível de fragmentos de colágeno tipo II clivado (**figura 63**) em camundongos do tipo selvagem comparado com veículo. O nível significantemente maior de fragmentos de colágeno tipo II resultante da administração de G-CNP37 indica mudança da matriz de cartilagem, sugerindo que G-CNP37 estimulou nova formação de osso em ossos em crescimento em camundongos do tipo selvagem.

[0948] Ambas as doses de Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38"), 20 e 70 nmol/kg, aumentaram significantemente o nível de cGMP no plasma ($p<0,05$) 15 minutos após administração comparado com camundongos do tipo selvagem tratados com veículo (**figura 64**). Administração da dose maior (70 nmol/kg) de Pro-Gly-CNP37 aumentou significantemente ($p<0,05$) o nível de colágeno tipo II clivado comparado com camundongos tratados com veículo (figura 65), sugerindo que a dose maior de Pro-Gly-CNP37 estimulou a mudança de matriz de cartilagem antes da formação de osso nova em camundongos do tipo selvagem. Ainda, administração da dose mais alta (70 nmol/kg) de Pro-Gly-CNP37 aumentou ($p<0,05$) o nível de fosfatase alcalina específica de osso comparado com camundongos tratados com veículo (**figura 66**), sugerindo que a dose mais alta de Pro-Gly-CNP37 aumentou a remo-

delagem de osso em camundongos do tipo selvagem.

Avaliação da imunogenicidade de variantes de CNP

[0949] Devido ao fato das variantes de CNP serem derivadas de peptídeo, é possível que administração dos pepeptídeos possa levar a uma resposta imunogênica *in vivo*. Para avaliar se uma resposta imune ocorreu após administrações sucessivas de variante de CNP, medições de níveis de anticorpo no soro foram realizadas.

[0950] Um ensaio de IgG foi realizado para avaliar se uma resposta imune IgG foi disparada por exposição de 5 semanas de camundongos FGFR3ach acondroplásticos a CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) ("CNP27-PEO24") (SEQ ID Nº: 36). IgG é a imunoglobulina mais predominante em soro de camundongo e humano e é produzido como parte da resposta imune *sec*undária a um antígeno. A resposta de IgG à administração dos peptídeos CNP foi determinada como segue. Placas de 96 poços foram revestidas com 100 ng/mL de CNP22, CNP37 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) em tampão de PBS BupH (Pierce/Thermo, Nº Cat. 28372, Rockford, Illinois). Após incubação da noite para o dia, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio Caseina-PBS (Pierce/Thermo, Nº Cat. 37528) por duas horas em temperatura ambiente com agitação a 300 rpm. Após lavagem com tampão de lavagem (1x PBS com Tween 0,05%), amostras de soro diluídas de uma sangria terminal (diluída 1:25) foram adicionadas à placa. Controles positivos e negativos foram também carregados na placa. Controle positivo era soro diluído 1:25 (agrupado de 6 camundongos FVB individuais) com anticorpo anti-CNP22 adicionado (Bachem rabbit anti-CNP22 IgG, No.Cat. T-4222) em diluição 1:1000. Controle negativo era o soro agrupado diluído. Após duas horas de incubação, as placas foram lavadas e anticorpo *sec*undário diluído em tampão de bloqueio foi adicionado às poços. Para as amostras de soro de camundongo, Fcγ IgG

anticamundongo (peroxidase-conjugated affini-pure goat anti-mouse IgG, Fcγ fragment, Nº Cat. 115-035-071, Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania) foi adicionado em uma diluição 1:10.000. Para os controles positivos e negativos, IgG-HRP anticoelho (Santa Cruz Biotechnology, No.Cat. SC-2004, Santa Cruz, California) foi adicionado a tampão de bloqueio. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente com agitação a 300 rpm, as placas foram lavadas com tampão de lavagem. 100 uL de TMB (One-step TMB, Pierce/Thermo, Nº Cat. 34022) foram adicionados a todas as poços. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos com agitação a 300 rpm. Reações colorimétricas foram paradas através da adição de 100 uL de $H_2SO_4$ 2N. As placas foram lidas a 450 nm (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, California) e os dados foram analisados usando SoftMax Pro software (Molecular Devices).

[0951] Amostras de soro de camundongos $FGFR^{3ach}$ tratados com CNP22 ou PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) não indicaram nenhuma resposta imune IgG positiva em nenhum dos camundongos. Apenas um de nove camundongos $FGFR^{3ach}$ tratados com CNP37 mostrou uma resposta IgG ligeiramente positiva.

[0952] A resposta imunogênica de camundongos do tipo selvagem administrados com G-CNP37, PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ou Pro-Gly-CNP37, conforme medido através de um aumento em nível de IgG no soro, foi também avaliada através do exame de amostras de soro de sangria terminal conforme descrito acima. Nenhum dos camundongos do tipo selvagem tratados com PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (SEQ ID Nº: 36) ou Pro-Gly-CNP37 (20 ou 70 nmol/kg) mostrou uma resposta imune IgG positiva e apenas um de seis camundongos do tipo selvagem administrados com G-CNP37 mostrou uma resposta de IgG ligeiramente positiva.

<u>Medição de biomarcadores sob regimes de dosagem de CNP diferentes</u>

[0953] Camundongos FVB do tipo selvagem foram tratados diariamente por 9 semanas através de injeção subcutânea (s.c.) de veículo (tampão de ácido acético 30 mM/acetato, álcool benzílico 1%, sacarose 10%, pH 4,0) ou Pro-Gly-CNP37 ("Pro-CNP38") sob regimes de dosagem diferentes. O Grupo 1 incluía camundongos tratados com veículo injetados s.c. diariamente por 9 semanas seguido por uma semana sem nenhum tratamento. O Grupo 2 incluía camundongos tratados com Pro-Gly-CNP37 (20 nmol/kg) uma vez por dia por uma semana, seguido por três doses por semana por 8 semanas, seguido por uma semana sem nenhum tratamento. O Grupo 3 continha camundongos tratados com Pro-Gly-CNP37 (20 nmol/kg) uma vez por dia em semanas alternadas (semanas 1, 3, 5, 7 e 9), com uma semana sem nenhum tratamento seguido por cada semana de tratamento. O Grupo 4 continha camundongos tratados com Pro-Gly-CNP37 (5 nmol/kg) uma vez por dia por 9 semanas seguido por uma semana sem nenhum tratamento. Finalmente, o Grupo 5 incluía camundongos tratados com Pro-Gly-CNP37 (5 nmol/kg) uma vez por dia por 5 semanas sem nenhuma semana sem nenhum tratamento. Soro de sangria terminal foi coletado do camundongo e colágeno tipo II clivado, fosfatase alcalina total e níveis de anticorpo totais foram medidos dele. Os níveis de colágeno tipo II clivado foram medidos conforme descrito acima. Os níveis de fosfatase alcalina, predominantemente do fígado e ossos, foram medidos com o auxílio de uma instalação de teste de laboratório de diagnóstico veterinário (Antech).

[0954] Um ensaio de anticorpo total foi desenvolvido para avaliar a resposta imune potencial. A plataforma usada para o ensaio de anticorpo total eram um ensaio eletroquimioluminescente (ECLA). A plataforma de ECLA utiliza um fármaco marcado com biotina (aqui, biotina-Pro-Gly-CNP37) e um fármaco marcado com rutênio (aqui, Ru-Pro-Gly-CNP37). O fármaco marcado com biotina se liga a uma placa revestida

com estreptavidina que contém eletrodos, e o fármaco marcado com rutênio funciona como o componente de detecção do ensaio, uma vez que o rutênio pode ser eletroquimicamente estimulado. Um anticorpo específico de fármaco (aqui, um anticorpo específico de CNP) se liga ao fármaco marcado com biotina e ao fármaco marcado com rutênio e "forma ponte" entre os dois fármacos marcados. Dentre as vantagens da plataforma ECLA, qualquer isotipo de anticorpo (IgG, Igm, etc) pode ser detectado, e o ensaio ECLA é independente de espécie.

[0955] O ensaio de anticorpo total foi realizado como segue. Pro-Gly-CNP37 foi marcado com biotina em uma razão de provocação 4:1 e Pro-Gly-CNP37 foi também marcado separadamente com rutênio em uma razão de provocação 10:1. Ambas as reações de marcação separadas foram extintas através da adição de glicina e as amostras de ambas as reações tiveram tampão trocado para PBS. QCs baixos e altos foram preparados usando anticorpo anti-CNP22 comercialmente disponível (Bachem rabbit anti-CNP22 IgG, No.Cat. T-4222) adicionado em concentrações baixas e altas a soro de camundongo FVB diluído 5%. Amostras de soro de camundongo foram diluídas para 5% usando diluente de ensaio (BSA 5% em PBS, Nº Cat. MSD R93AA-1). Uma solução de trabalho foi preparada adicionando Pro-Gly-CNP37 marcado com biotina para ensaiar diluente, então adição de Pro-Gly-CNP37 marcado com rutênio para ensaiar diluente, e então combinação das duas soluções juntas. Vinte e cinco uL de QCs baixos e altos foram carregados na placa como controles. Então 25 uL de amostra foram adicionados a uma placa de 96 poços de não ligação, seguido pela adição de 50 uL de solução de trabalho a todas as poços. Amostras e QCs foram incubados com solução de trabalho em temperatura ambiente por 2 horas com agitação a 350 rpm. Nesse ínterim, uma placa de estreptavidina de MSD (No. Cat. MSD L13SA-1) foi bloqueada com tampão de bloqueio (MSD Nº Cat. R93AA-1) em temperatura

ambiente por 2 horas com agitação a 350 rpm. No final da incubação de duas horas, a placa de estreptavidina de MSD foi lavada e então 50 uL de amostra ou QC foram transferidos para a placa de MSD. A placa foi então incubada em temperatura ambiente por 1 hora com agitação a 350 rpm. No final da incubação de 1 hora, a placa de MSD foi lavada e 150 uL de tampão de leitura 2x (No. Cat. MSD R92TC-2) foram adicionados à placa. A placa foi lida usando uma máquina MSD PR400.

[0956] Todos os cinco grupos de camundongos exibiram níveis substancialmente comparáveis de colágeno tipo II clivado (**figura 67**). Tratamento de camundongos no Grupo 5 com 5 nmol/kg de Pro-Gly-CNP37 uma vez por dia por 5 semanas aumento significantemente ($p<0,001$) o nível de fosfatase alcalina (figura 68), que é indicativo de remodelagem óssea. Amostras de soro de cada um dos quatro grupos de camundongos tratados com Pro-Gly-CNP37 não mostrou uma resposta de anticorpo positiva no ensaio de anticorpo total.

[0957] Sem ser limitado pela teoria, há explicações possíveis do por que os quatro grupos de camundongos tratados com CNP não exibiram diferença estatisticamente significante em colágeno tipo II clivado comparado com camundongos tratados com veículo, e por que apenas os camundongos tratados com CNP no Grupo 5 exibiram um aumento estatisticamente significante em nível de fosfatase alcalina total comparado com camundongos tratados com veículo. É possível que por causa dos camundongos tratados com veículo no estudo estivessem também crescendo, colágeno tipo II clivado e fosfatase alcalina, que são biomarcadores de crescimento, foram também produzidos nos camundongos tratados com veículo. Ainda, houve um período de uma semana sem nenhum tratamento para os camundongos em cada um dos Grupos 1 a 4, o que possivelmente diluiu quaisquer mudanças nos níveis de no colágeno tipo II clivado e fosfatase alcalina totais entre os camundongos tratados com CNP nos Grupos 1-3 e os camundongos tratados com veículo. Não hou-

ve nenhum período sem tratamento para os camundongos tratados com CNP no Grupo 5 e esses camundongos exibiram nível de fosfatase alcalina total significantemente maior ($p<0,01$) comparado com camundongos tratados com veículo.

Exemplo 15

Dose Respostas de Variantes de CNP em Camundongos

[0958] Os efeitos de doses variáveis de variantes de CNP foram avaliados em camundongos FVB do tipo selvagem.

[0959] Para o estudo de dose, em dois estudos separados (S1 e S2), grupos de 10 camundongos foram administrados com Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") a 20 e 70 nmol/kg subcutaneamente uma vez por dia para 36 injeções. O comprimento da cauda e o peso do corpo foram medidos durante o curso do tratamento. Os animais foram sacrificados no final do experimento e o comprimento do osso avaliado.

[0960] O comprimento da cauda de animais tratados com veículo era aproximadamente 8 cm no dia 36, enquanto os animais tratados com 20 nmol/kg de Proc-CNP38 exibiram comprimento de cauda de aproximadamente 8,75 cm e 70 nmol/kg de Pro-CNP38 aumentou o comprimento da cauda para aproximadamente 9,5 cm. Administração de Pro-CNP38 em qualquer dose induz um aumento relativo significante ($p<0,05$) em comprimento do corpo total comparado com animais tratados com controle, demonstrando um aumento de aproximadamente 130% em velocidade de crescimento a 20 nmol/kg e aproximadamente um aumento de 160% em velocidade de crescimento a 70 nmol/kg de Pro-CNP38 (**figura 69**).

[0961] Tratamento com Pro-CNP 38 também aumentou significantemente o comprimento do osso na maioria dos ossos longos avaliados bem como naso-anal total (comprimento do corpo) do animal. A Tabela 14 é representativa do aumento % relativo em comprimento do osso em animais tratados em comparação com animais tratados com veículo.

Tabela 14

| Pro-CNP38 | Cauda | Naso-Anal | LV4-6 | Fêmur | Tíbia | Húmero | Ulna |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **20 nmol/kg** | 8%* | 7%* | 10%* | 7%* | 4%* | 3%* | 3% |
| **70 nmol/kg** | 16%* | 13%* | 13%* | 10%* | 7%* | 4%* | 5%* |

Aumento % relativo, * p<0,05 ANNOVA (Dunnett's) v veículo

[0962] Densidade mineral óssea (BMD) e teor mineral ósseo (BMC) foram também avaliados após administração de Pro-CNP38 em doses diferentes. Os resultados (**figura 70**) mostraram que administração de Pro-CNP38 a 70 nmol/kg diminuiu significantemente a densidade mineral óssea (**figura 70A**) e aumentou o teor mineral ósseo (**figura 70B**), sugerindo que há um retardo em mineralização do osso em animais tratados, mas o processo de mineralização em si não é afetado de modo adverso pelo tratamento com CNP.

[0963] Não houve mudanças significantes em peso de órgão entre animais tratados com Pro-CNP38 ou veículo.

Estudos bioanalíticos de dose resposta em camundongos

[0964] Estudos bioanalíticos foram realizados para medir marcadores de atividade de CNP após administração *in vivo* de doses variáveis de Pro-CNP38. Os níveis de cGMP no plasma, níveis de colágeno tipo II no soro e níveis de fosfatase alcalina de amostras *in vivo* foram analisados. Camundongos do tipo selvagem foram administrados com 20 e 70 nmol/kg de Gly-wtCNP37 ("CNP38"), 20 e 70 nmol/kg de Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") e 70 e 200 nmol/kg de GHKSEVAHRFK-wtCNP27 ("HSA-CNP27") (SEQ ID Nº: 144) subcutaneamente uma vez por dia por 36 dias. Plasma foi coletado 15 minutos após a última injeção no dia 36 e os camundongos foram sacrificados 24 horas depois. No sacrifício, o soro de sangria terminal foi coletado e usado para análise de biomarcador conforme descrito anteriormente.

[0965] A **figura 71** mostra que 20 nmol/kg de CNP38 e 70 nmol/kg de HSA-CNP27 aumentou significantemente cGMP do plasma

(p<0,01), aumentando os níveis de cGMP no plasma para aproximadamente 300 pmol e 400 pmol, respectivamente. Administração de 70 nmol/kg de CNP38 aumentou cGMP para aproximadamente 500 pmol (p<0,01), enquanto administração de 70 nmol/kg de Pro-CNP38 aumentou cGMP para aproximadamente 575 pmol (p<0,001). Administração de 200 nmol/kg de HSA-CNP27 aumentou cGMP para aproximadamente 675 pmol (p<0,001).

[0966] Variantes de CNP também aumentaram significantemente os níveis de colágeno tipo II clivado no soro (**figura 72**). CNP38 a 20 nmol/kg aumentou colágeno para aproximadamente 9 pg/ml (p<0,05), CNP38 para 70 nmol/kg aumentou colágeno para aproximadamente 8 pg/ml (p<0,05), Pro-CNP38 a 20 nmol/kg aumentou colágeno para aproximadamente 12 pg/ml (p<0,05), Pro-CNP38 a 70 nmol/kg aumentou colágeno para aproximadamente 16 pg/ml (p<0,05), HSA-CNP27 a 70 nmol/kg aumento colágeno para aproximadamente 10 pg/ml e HSA-CNP27 a 200 nmol/kg aumentou colágeno para aproximadamente 10 pg/ml (p<0,05).

[0967] Níveis de fosfatase alcalina (AP) no soro também aumentaram após administração de variantes de CNP (**figura 73**). CNP38 a 20 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 130 IU/L, CNP38 a 70 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 160 IU/L (p<0,01), Pro-CNP38 a 20 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 155 IU/L (p<0,001), Pro-CNP38 a 70 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 180 IU/L (p<0,001), HSA-CNP27 a 70 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 120 IU/L e HSA-CNP27 a 200 nmol/kg aumentou AP para aproximadamente 140 IU/L (p<0,01). A **Tabela 15** ilustra a porcentagem de AP total que é específica de osso.

Tabela 15

| | **Total AP IU/L** | **AP Específico de Osso IU/L** | **% de Alk Phos Total** |
|---|---|---|---|
| Veículo | 109,8 | 24,7 | 22,5 |

| | Total AP IU/L | AP Específico de Osso IU/L | % de Alk Phos Total |
|---|---|---|---|
| CNP38 (20 nmol/kg) | 135,9 | 47,9 | 35,2 |
| CNP38 (70 nmol/kg) | 166,3 | 63,5 | 38,2 |
| Pro-CNP38 (20 nmol/kg) | 159,9 | 65,9 | 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 |

[0968] Análise de anticorpos anti-CNP mostrou que apenas HSA-CNP27 elicitou uma resposta de anticorpo IgG em camundongos.

[0969] Os resultados acima ilustram que administração de variantes de CNP aumenta a concentração de colágeno tipo II e fosfatase alcalina em soro, indicando que CNP aumenta fatores relevantes para crescimento de osso aumentado e sugere que administração de variantes de CNP em doses tão baixas quanto 20 nmol/kg são eficazes em aumento de crescimento ósseo *in vivo*.

Resposta de cGMP após regimes de dose diferentes

[0970] Análise bioanalítica foi também avaliada em momentos diferentes após administração de Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") a camundongos CD-1 do tipo selvagem, 8-10 semanas de vida (n=3 por grupo de tratamento). Pro-CNP38 foi dado em uma dose subcutânea de 200 nmol/kg e os níveis de cGMP medidos em 15 minutos, 3 horas, 1 dia, 2 dias e 3dias pós-injeção no plasma, epífise, osso cortical (medula óssea removida), pulmão e cérebro. Sangue foi coletado em K2EDTA. Epífises da tíbia e femoral e osso cortical, parte externa do ouvido, cérebros, rins e pulmões foram coletados, postos em água fervente por 5 minutos, então congelados para -70°C. Ambos o plasma e o tecido foram ensaiados quanto a cGMP (Cayman Chemical cyclic GMP ELISA kit).

[0971] Os resultados mostraram que os níveis de cGMP aumentaram em 15 minutos pós-injeção em plasma (aproximadamente 1300 pmol/ml) e epífise (aproximadamente 25 pmol/ml/mg). Por volta de 3 horas, os níveis no plasma tinham diminuído aproximadamente para

níveis controle, enquanto níveis na epífise eram aproximadamente 3 vezes menores do que os níveis de cGMP em 15 minutos pós-injeção, mas maiores do que os níveis controle. Níveis de osso cortical aumentaram para aproximadamente 0,5 pmol/ml/mg em 15 minutos e permaneceram nesse nível em 3 horas. Os níveis de cGMP em todos os pontos de tempo estavam de volta para níveis controle por volta de 1 dia após injeção. Pouco a nenhum cGMP foi detectado em pulmão ou cérebro em qualquer ponto de tempo.

[0972] Os níveis de cGMP foram também medidos em camundongos administrados com injeções múltiplas de Pro-CNP38. Grupos de camundongos (n=3) receberam Pro-CNP38 como segue: 20 nmol/kg de dose única, subcutaneamente; 200 nmol/kg de dose única, subcutaneamente; 20 nmol/kg subcutaneamente nos dias 0 e 1; 200 nmol/kg subcutaneamente nos dias 0 e 1; 20 nmol/kg subcutaneamente nos dias 0 e 3; 200 nmol/kg subcutaneamente nos dias 0 e 3. Os camundongos foram sacrificados 15 minutos após a dose final de Pro-CNP38 e os níveis no plasma de cGMP analisados. Parece não haver uma modulação do sinal de cGMP no plasma devido a regimes de dose diferentes. Respostas de cGMP na cartilagem também foram investigadas.

Avaliação de dessensibilização potencial de receptor NPR-B

[0973] Análise histológica mostra que CNP, quando administrado diariamente a 200 nmol/kg, acumula na placa de crescimento de animais, com base em imunorreatividade de CNP aumentada. É possível que este acúmulo, ou estimulação diária de receptor de CNP, na placa de crescimento pudesse dessensibilizar o receptor de CNP.

[0974] Para determinar se dosagem múltipla dessensibiliza o receptor NPR-B *in vitro*, condrócitos articulares humanos normais foram culturados com Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") por tempos variáveis e *sec*reção de cGMP medida.

[0975] Condrócitos humanos normais primários isolados de carti-

lagem articular foram culturados conforme recomendado pelo fornecedor (Lonza). A 60-80% de confluência, os condrócitos foram tratados com 1 uM de Pro-CNP38 duas vezes, com quantidades grandes de tempo entre os tratamentos (primeiro tratamento no momento 0, então em 15 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h após o tratamento inicial). No experimento que segue os tratamentos foram ou aplicados duas vezes, com quantidades grandes de tempo entre tratamento (primeiro tratamento no momento 0, então em 6, 16, 24, 48 h após tratamento inicial), ou apenas uma vez, em paralelo com o segundo tratamento (apenas em respostas puras em 6, 16, 24 e 48 h). Os tratamentos foram ou aplicados por 15 min apenas (tratamento agudo) ou durante o experimento (tratamento crônico quando CNP foi deixado no meio). Lisatos de célula e meio condicionado foram coletados e analisados quanto à *sec*reção de cGMP total (ELISA Molecular Devices).

[0976] Em um experimento a curto prazo, as células foram estimuladas com Gly-wtCNP37 ("CNP38") 1 uM duas vezes por 15 minutos (tratamento agudo) ou duas vezes com CNP38 durante a cultura (tratamento crônico). Os períodos entre os tratamentos foram 15 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 4 h e 6 h. Estimulação de cGMP de pico foi obtida através de tratamento das células apenas uma vez, no último ponto de tempo do experimento (6 horas; >0,1 pmol/poço no experimento agudo e 0,2 pmol/poço no experimento crônico). No experimento agudo, quando as células são tratadas duas vezes, a resposta diminui para 0,1 pmol/poço se as células forem tratada no momento 0 e então novamente em 15 minutos. Em um experimento agudo, quando as células são tratadas duas vezes, a resposta diminui para aproximadamente 0,5 pmol/poço se as células forem tratadas no tempo 0 e novamente em 30 min, 60 min, 2, 3 e 4 horas. No experimento crônico, quando as células são tratadas duas vezes, a resposta diminui para aproximadamente 0,16 pmol/poço se as células forem tratadas no tempo 0 e em 15 minu-

tos. No experimento crônico, quando as células são tratadas duas vezes, a resposta diminui para aproximadamente 0,6 pmol/poço se as células forem tratadas no tempo 0 e novamente em 30 min, 60 min ou 2 horas. No experimento crônico, quando as células são tratadas duas vezes, a resposta diminui para <0,5 pmol/poço se as células foram tratadas no tempo 0 e novamente em 2, 4 ou 6 horas.

[0977] Estudos a longo prazo foram também realizados. Para tratamento agudo, CNP38 1 uM foi adicionado à cultura celular conforme acima descrito. Para tratamento crônico, CNP38 1 uM foi adicionado à cultura celular durante todo o experimento conforme acima descrito. Os resultados indicam que o receptor NPR-B pode dessensibilizar após administração de CNP diária, repetida, *in vitro* e 48 horas entre as doses são suficiente para recuperar para 60% da resposta de NPR-B máxima para CNP38, se o CNP for removido após a primeira dose, e para <40% se CNP for incubado durante o experimento (**figura 74**).

[0978] Para avaliar se tratamento com uma variante de CNP dessensibiliza o receptor NPR-B *in vivo*, os experimentos foram conduzidos com camundongos do tipo selvagem. Camundongos machos CD-1 de 8-10 semanas de vida foram injetados subcutaneamente com controle veículo ou Pro-Gly-wtCNP37 ("Pro-CNP38") a 200 nmol/kg nos dias apropriados. Os camundongos ou foram injetados com Pro-CNP38 diariamente por até 8 dias ou foram injetados com Pro-CNP38 no primeiro dia, nos primeiro e segundo dias ou nos primeiro e terceiro dias do estudo. Quinze minutos seguindo a injeção final, os camundongos (n=3 por grupo de tratamento) foram profundamente anestesiados e exsanguinados através de toracotomia e canulação aórtica. Sangue em circulação foi retirado do corpo com PBS através de uma cânula aórtica. Os rins e as tíbias direitas, fêmures direitos e fêmures esquerdos foram coletados, fervidos em água por 5 minutos e/ou rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em gelo

*sec*o ou em um freezer a -70°C até o ensaio de cGMP. Para estimativa de produção de cGMP em cartilagem, fêmures distais e/ou tíbias proximais foram dis*sec*ados, pesados e pulverizados usando Covaris Cryoprep CP02. As amostras em pó foram homogeneizadas usando um sonificador Covaris E210 em ácido perclórico 5% e neutralizadas em KOH 60%. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm a 4º C por 5 minutos e o sobrenadante foi usado para o ensaio de cGMP (Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit, Cayman, Michigan). Ainda, as tíbias esquerdas foram coletadas, fixadas em formalina tamponada normal 10% e guardadas para análise imunoistoquímica adicional.

[0979] A **figura 75A** mostra que tratamento diário repetido de camundongos do tipo selvagem com 200 nmol/kg de Pro-CNP38 por 1, 4, 6, 7 e 8 dias não resultou em dessensibilização da resposta de cGMP. Ao contrário, potencialização da resposta de cGMP foi observada após 4 dias de tratamento diário. Tratamento diário adicional resultou em um platô da resposta de cGMP, até 8 dias. Os resultados indicam que tratamento diário de camundongos do tipo selvagem com 200 nmol/kg de Pro-CNP38 por até 8 dias não dessensibiliza a resposta de cGMP.

[0980] A cinética da resposta de cGMP em cartilagem femoral distal após tratamento dos camundongos do tipo selvagem com Pro-CNP38 foi também investigada. Tratamento dos camundongos uma vez por dia por dois dias potencializou a resposta de cGMP a Pro-CNP38, comparado com a resposta de cGMP a um tratamento único (**figura 75B**). Quando os camundongos foram tratados nos primeiro e terceiro dias, mas não nos primeiro e segundo dias, a resposta de cGMP após o segundo tratamento (no terceiro dia) foi substancialmente similar à resposta de cGMP observada após um tratamento único de um dia (**figura 75B**). Esses resultados sugerem que dosagem em dias cons*ec*utivos é benéfica para potencialização da resposta de cGMP a

Pro-CNP38 neste estudo de camundongo.

Ativação de NPR-B em tecidos diferentes

[0981] Para avaliar ativação potencial de NPR-B em tecidos diferentes por uma variante de CNP, camundongos CD-1 machos do tipo selvagem foram injetados com 200 nmol/kg de Gly-CNP37 e a resposta de cGMP foi medida em certos tecidos em pontos de tempo diferentes. Dois camundongos foram usados para cada grupo de tratamento. Cada camundongo recebeu uma injeção subcutânea de Gly-CNP37 ou controle veículo. Quinze, 30 ou 60 minutos ou 3 horas seguindo a injeção, os camundongos foram profundamente anestesiados e exsanguinados através de toracotomia e canulação aórtica. Sangue em circulação foi removido através de um fluxo de PBS com uma cânula aórtica. Coração, fígado, pulmão, rim, parte externa do ouvido, aorta e cérebro foram coletados. Todos os tecidos foram fervidos em água por 5 minutos, finamente dis*sec*ados (incluindo fluxo de medula óssea de córtices femorais com PBS), pesados, esfriados em nitrogênio líquido e pulverizados em um BioPulverizer. As amostras em pó resultantes foram homogeneizadas com um Polytron em ácido perclórico pré-esfriado e neturalizadas com KOH 60%. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm e 4º C por 5 minutos e o sobrenadante foi usado para o ensaio de cGMP (Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit, Cayman, Michigan). Os resultados foram normalizados para peso de tecido.

[0982] Secreção de cGMP em resposta a tratamento com Gly-CNP37 ("CNP" na **figura 76**) era detectável em fêmures distais (cartilagem e osso), córtices femorais (osso), parte externa do ouvido (cartilagem) e rim (**figuras 76A-D**). Respostas de cGMP máximas nesses tecidos foram observadas 15 min após tratamento. Tecidos do fígado, coração, pulmão e cérebro não exibiram secreção de cGMP apreciável em resposta a Gly-CNP37 com relação a controle veículo nos pontos de tempo de estudo (**figuras 76E-H**). Os resultados indicam que tra-

tamento com 200 nmol/kg de Gly-CNP37 estimulou a secreção de cGMP em tecidos de cartilagem, osso e renais.

Exemplo 16

Doses Respostas de Variantes de CNP em Macacos

[0983] Os efeitos da variante de CNP Pro-Gly-CNP37 sobre crescimento de osso e os níveis de biomarcadores relacionados a crescimento de osso são avaliados em macacos cinomólogos. Oito macacos cinomólogos juvenis normais (cerca de 2,5 anos de idade no início do estudo em andamento) são subcutaneamente injetados diariamente com 10 ou 36 µg/kg/dia de Pro-Gly-CNP37 (n = 4 por grupo de dose). Quatro de tais macacos são administrados com veículo como controle. A duração total do tratamento são 6 meses. Várias medições de expansão de placa de crescimento e crescimento de osso são feitas através de raio X digital e imagem de ressonância magnética e através da medição de comprimentos de membro e corpo externamente. Amostras de sangue e urina são coletadas periodicamente para patologia clínica e medição dos níveis de Pro-Gly-CNP37 e biomarcadores. Seguindo o término do estudo, patologia bruta é realizada e as amostras de tecido são avaliadas histologicamente para avalição de eficácia e segurança.

[0984] Os dados obtidos até agora no estudo em andamento mostram que ambas as doses de Pro-Gly-CNP37 têm largura de placa de crescimento aumentada através de raio X digital (**figura 77**), comprimentos das tíbias direita e esquerda aumentados através de raio X digital (**figuras 78A e B**), comprimento da perna aumentado através de medição externa (**figura 79**), comprimento do braço aumentado através de medição externa (**figura 80**), comprimento do corpo aumentado através de medição externa (figura 81) e nível no soro aumentado de fosfatase alcalina, um biomarcador para formação de osso (**figura 82**). Os dados demonstram que Pro-Gly-CNP37 podem estimular crescimento de osso em macacos cinomólogos juvenis normais em

doses hemodinamicamente aceitáveis.

Exemplo 17

Efeitos de Variantes de CNP sobre Sistema Cardiovascular em Camundongos

[0985] Peptídeos natriuréticos tal como CNP foram relatados afetar o sistema cardiovascular. Wang e outros (*Eur. J. Heart Fail.* 9:548-57, 2007) descrevem que CNP foi mostrado ter um efeito cardiprotetor na prevenção de lesão por isquemia/reperfusão miocardiana e aperfeiçoamento da remodelagem cardíaca após infarto do miocárdio em ratos. Wang demonstrou que camundongos superexpressando CNP têm incidência reduzida de hipertrofia cardíaca causada por infarto do miocárdio. Ainda, CNP foi mostrado causar vasodilatação independente do endotélio (M. Honing e outros*, Hypertension,* 37:1179–1183 (2001)) e então pode diminuir transientemente a pressão sanguínea *in vivo*.

[0986] Para avaliar os efeitos de variantes de CNP sobre o sistema cardiovascular, a pressão sanguínea e a taxa cardíaca em camundongos FVB do tipo selvagem anestesiados são estudadase seguindo injeção subcutânea das variantes.

[0987] Após um estudo piloto para definir uma faixa de dose ampla de atividade cardiovascular, um estudo de dose-resposta é conduzido para examinar os efeitos de três níveis de dose diferentes de cada variante de CNP. Três camundongos FVB machos de 8 semanas de idade compreendem cada grupo de tratamento. As doses são administradas subcutaneamente a camundongos anestesiados e pressões arteriais sistólica, diastólica e média (MAP), bem como a taxa cardíaca, são monitoradas através de transdutores de pressão intra-arterial implantados.

Exemplo 18

Formulação de Variantes de CNP

[0988] Estudos de pré-formulação de CNP foram realizados para avaliar a estabilidade de variante de CNP Gly-wtCNP37 ("CNP38") em

pHs diferentes (pH 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) e temperaturas (5°C, 25°C e 40°C) com o tempo. CNP38 exibiu estabilidade maior em pH 4-6 do que nos outros pHs nos estudos. CNP38 era estável a 5°C em pH 4-6, com ≥ cerca de 95% de CNP38 restando após 15 semanas. Quando a temperatura foi aumentada para 25°C, em pH 4 cerca de 85% de CNP38 restaram após 15 semanas, em pH 5 cerca de 85% restaram após 15 semanas e em pH 6 cerca de 80% restaram após 15 semanas. Quando a temperatura foi aumentada para 40°C, em pH 4 cerca de 55-60% de CNP38 restaram após 15 semanas, em pH 5 cerca de 65% restaram após 15 semanas e em pH 6 cerca de 40% restaram após 15 semanas. A **figura 83** ilustra o gráfico observado de constante de taxa de degradação de pseudo-primeira ordem ($K_{obs}$) vs. pH de pH 3 a 8 e a 5°C, 25°C e 40°C. Os dados de estabilidade para CNP38 nos estudos de pré-formulação sugerem formulações de CNP tendo um pH na faixa de a partir de cerca de 4 a cerca de 6. Um pH ácido (por exemplo, pH ≤ cerca de 6) pode promover a estabilidade de uma variante de CNP ao, por exemplo, minimizar ou evitar desaminação de resíduo(s) de asparagina e/ou glutamina, isomerização de resíduo(s) de ácido aspártico ou degradação da variante de CNP através de outros cursos.

[0989] Variantes de CNP podem ser formuladas em carreadores farmacêuticos para administração a indivíduos afetados por, por exemplo, condições de crescimento de osso. Em algumas modalidades, formulações líquidas de variantes de CNP são formuladas de acordo com quaisquer combinações dos ingredientes e suas quantidades ou concentrações na Tabela 16.

Tabela 16

| Classe de Ingrediente | Ingrediente | Faixa de Concentração |
|---|---|---|
| Ingrediente ativo | Variante de NCP | 10 mg/mL ± 9,9 mg/mL |
| Agente de tamponamento | Ácido acético/acetato | 10 mM ± 5 mM, ou pH 5 ± 1 |
| Agente de tamponamento | Ácido cítrico/citrato | 10 mM ± 5 mM, ou pH 5 ± 1 |

| Classe de Ingrediente | Ingrediente | Faixa de Concentração |
|---|---|---|
| Agente de ajuste de isotonicidade | NaCl | 140 mM ± 20 mM |
| Agente de ajuste de isotonicidade | Sacarose | 10% ± 5% |
| Conservante | m-Cresol | 0,4% ± 0,1% ou 0,2% |
| Conservante/antiadsorvente | Álcool benzílico | 1,5% ± 0,5% |
| Estabilizador | Glicerina (glicerol) | 5% - 100% (neat)[1] |
| Estabilizador | Metionina | 0,01% - 0,2% |
| Estabilizador | Ácido ascórbico/sal de ascorbato | 0,1% - 1% |
| Estabilizador | Tioglicerol | 0,1% - 1% |
| Antiadsorvente | Polissorbato 20<br>Polissorbato 80<br>Álcool benzílico | 0,001% - 0,5%<br>0,001% - 0,5%<br>0,5% - 1,5% |

[1]Glicerina é usada para minimizar ou prevenir hidrólise direcionada por água, desaminação, isomerização ou clivagem de variantes de CNP. Para formulações liofilizadas, 4-6% ou 6-20% de manitol ou sacarose podem substituir NaCl.

[0990] Em certas modalidades, formulações liofilizadas de variantes de CNP são preparadas a partir de formulações formuladas de acordo com quaisquer combinações dos ingredientes e suas quantidades ou concentrações na Tabela 17.

Tabela 17

| Classe de Ingrediente | Ingrediente | Faixa de Concentração |
|---|---|---|
| Ingrediente ativo | Variante de CNP | 10 mg/mL ± 9,9 mg/mL |
| Agente de tamponamento | Ácido acético/acetato | 10 mM ± 5 mM, ou pH 5 ± 1 |
| Agente de tamponamento | Ácido cítrico/citrato | 10 mM ± 5 mM, ou pH 5 ± 1 |
| Agente de ajuste de tonicidade/agente de volume | Sorbitol | 5% ± 3% |
| Agente de ajuste de tonicidade/agente de volume | Manitol | 5% ± 3% |
| Agente de ajuste de tonicidade/agente de volume | Sacarose | 10% ± 5% |
| Conservante | m-Cresol | 0,4% ± 0,2% |
| Conservante/antiadsorvente | Álcool benzílico | 1,5% ± 0,5% |
| Estabilizador | Glicerina (glicerol) | 5% - 100% (líquido)[1] |
| Estabilizador | Metionina | 0,01% - 0,2% |

| Classe de Ingrediente | Ingrediente | Faixa de Concentração |
|---|---|---|
| Estabilizador | Ácido ascórbico/sal de ascorbato | 0,1% - 1% |
| Estabilizador | Tioglicerol | 0,1% - 1% |
| Antiadsorvente | Polissorbato 20 | 0,001% - 0,5% |
| | Polissorbato 80 | 0,001% - 0,5% |
| | Álcool benzílico | 0,5% - 1,5% |

[1]Glicerina é usada para minimizar ou prevenir hidrólise direcionada por água, desaminação, isomerização ou clivagem de variantes de CNP.

[0991] Em certas modalidades, uma formulação compreendendo uma variante de CNP tem um pH de cerca de 3-7 ou cerca de 3-6 ou cerca de 3,5-6,5 ou cerca de 4-6 ou cerca de 4-5 ou cerca de 4,5-5,5. Em algumas modalidades, para pH 4-5,5 um agente de tamponamento adequado é ácido acético/acetato (por exemplo, acetato de sódio) e para pH 5,5-6 um agente de tamponamento adequado é ácido cítrico/citrato. Ácido cítrico/citrato (por exemplo, citrato de sódio) é também um agente de tamponamento adequado na faixa de pH 3-6 ou pH 4-6. Em certas modalidades, o agente de tamponamento tem uma concentração na formulação de cerca de 2-50 mM ou cerca de 2-40 mM ou cerca de 2-30 mM ou cerca de 5-30 mM ou cerca de 2-20 mM ou cerca de 5-20 mM ou cerca de 5-15 mM.

[0992] Para minimizar ou evitar desaminação de uma variante de CNP, a variante pode ser formulada em cossolventes orgânicos farmaceuticamente aceitais tais como glicerina, etanol e propileno glicol. Devido ao fato da desaminação ocorrer através de hidrólise, substituição de água por um cossolvente orgânico minimiza contato da variante de CNP com água. A concentração de um ou mais solventes orgânicos em um sistema de solvente orgânico-aquoso pode ser, por exemplo, de a partir de cerca de 10% a cerca de 99% ou cerca de 100% se água não for usada.

[0993] Também para minimizar ou evitar desaminação de uma variante de CNP, água pode ser removida da formulação através de liofi-

lização. Em algumas modalidades, as formulações liofilizadas contêm quaisquer combinações dos componentes que seguem:

[0994] tampão: acetato de sódio e ácido acético ou citrato de sódio e ácido cítrico;

[0995] agente de isotonicidade/volume: manitol (por exemplo, 3-10%, 208% ou 4-6%).

[0996] Sacarose (por exemplo, 6-20%, 5-15% ou 8-12%);

[0997] Antioxidantes: metionina e/ou ácido ascórbico com razão molar de cada antioxidante para variante de CNP de a partir de cerca de 0,1:1 a cerca de 1:1 ou de a partir de cerca de 0,5:1 a cerca de 5:1 ou de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 15:1 ou de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 10:1 ou de a partir de cerca de 3:1 a cerca de 10:1.

[0998] Desaminação pode ser também minimizada ou evitada através de armazenamento de uma composição de CNP (por exemplo, uma formulação líquida ou uma formulação liofilizada) em temperatura menor, tal como em cerca de 5°C, 0°C, -10°C, -20°C, -30°C, -40°C, -50°C, -60°C, -70°C, -80°C, -90°C ou -100°C.

[0999] Para minimizar ou evitar oxidação de resíduos oxidáveis (por exemplo, metionina) em uma variante de CNP, a variante pode ser formulada com um ou mais oxidantes. Antioxidantes exemplares incluem, mas não estão limitados a, metionina, ácido ascórbico e tioglicerol. Oxidação de, por exemplo, resíduos de metionina pode ser também minimizada ou prevenida através de purga de oxigênio a partir de um meio líquido (se uma formulação líquida) com nitrogênio ou argônio e/ou purga de oxigênio a partir de um recipiente ou embalagem com nitrogênio ou argônio.

[01000] Em algumas modalidades, para minimizar ou prevenir adsorção (por exemplo, adsorção de uma variante de CNP a plástico ou vidro), Polissorbato 20, Polissorbato 80 ou álcool benzílico, ou uma combinação dos mesmos, é adicionada a uma formulação de CNP. Em certas moda-

lidades, cada um do(s) antiadsorventes(s) está em uma concentração de a partir de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% e de a partir de cerca de 0,01% a cerca de 0,5% ou de a partir de cerca de 0,1% a cerca de 1% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 1% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 1,5% ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 2% ou de a partir de cerca de 1% a cerca de 2%. Faixa(s) exemplar(es) de antiadsorvente(s) na formulação incluem, sem limitação, de a partir de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% de Polissorbato 20, de a partir de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% de Polissorbato 80 e/ou de a partir de cerca de 0,5% a cerca de 1,5% de álcool benzílico.

[01001] Em certas modalidades, uma formulação de CNP líquida compreende, ou uma formulação de CNP liofilizada é preparada a partir de uma formulação que compreende, (1) um tampão de ácido acético/acetato (por exemplo, acetato de sódio) tendo uma concentração de cerca de 30 mM ± 5 ou 10 mM de agente de tamponamento e um pH de cerca de 4 ± 0,5 ou 1 e (2) álcool benzílico (por exemplo, como um conservante e/ou antiabsorvente) em uma concentração de cerca de 1% ± 0,5% e opcionalmente (3) sacarose em uma concentração de cerca de 10% ± 5%.

Exemplo 19

Avaliação Clínica de Variantes de CNP

[01002] Os exemplos que seguem proveem orientação dos parâmetros a serem usados para a avaliação clínica de composições compreendendo CNP22 ou suas variantes nos métodos terapêuticos da presente invenção. Conforme aqui discutido, CNP22 ou suas variantes serão usados no tratamento de distúrbios responsivos a CNP, incluindo distúrbios do osso e músculo liso vascular. Testes clínicos serão conduzidos, os quais vão prover uma avaliação de doses de CNP22 ou suas variantes quanto à segurança, farmacocinética e resposta inicial de ambos os pontos finais clínicos substitutos e definidos. O teste

será conduzido por um mínimo de, mas não necessariamente limitado a, 24 semanas para coletar informação de segurança suficiente em cerca de 100 pacientes com condições de serem avaliados. A dose inicial para os testes vai variar de a partir de cerca de 0,001 a cerca de 1,0 mg/kg/semana ou qualquer uma das doses descritas aqui. No caso da dose inicial nesta faixa não produzir um benefício clínico direto significante, a dose deve ser aumentada dentro desta faixa ou estar além desta faixa conforme necessário e mantida por um período mínimo adicional de, mas não necessariamente limitado a, 24 semanas para estabelecer segurança e ainda avaliar eficácia.

[01003] Medições de segurança vão incluir eventos adversos, reações alérgicas, painel de química clínica completo (incluindo funções renais e do fígado), urinálise e CBC com diferencial. Ainda, outros parâmetros relevantes para benefício clínico serão monitorados. O presente exemplo também inclui a determinação de parâmetros farmacocinéticos de CNP22 ou suas variantes, incluindo absorção, distribuição, metabolismo, excreção e meia-vida e biodisponibilidade no sangue. É antecipado que tais análises ajudarão a relacionar dose à resposta clínica.

Métodos

[01004] Os pacientes vão sofrer um exame de história médica e físico de linha de base e um conjunto padrão de testes de laboratório clínicos (incluindo CBC, Painel 20, CH50 e UA). Os pacientes serão acompanhados de perto com visitas semanais à clínica. Os pacientes vão retornar para a clínica para uma avaliação completa uma semana após o término do período de tratamento. Se escalonamento de dose for necessário, os pacientes vão seguir o mesmo programa mostrado acima. A segurança será monitorada durante o teste.

Diagnóstico e Critérios de Inclusão

[01005] Os pacientes devem ser homens ou mulheres, com um diag-

nóstico documentado de um distúrbio potencialmente responsivo a CNP. Um exemplo específico de um distúrbio relacionado a osso, potencialmente responsivo a CNP, é acondroplasia, que pode ser confirmado através de teste genético e outra evidência de uma mutação ou disfunção de FGFR-3. A faixa de idade ideal de pacientes com acondroplasia será de bebê (<1 ano de idade) até a pré-adolescência (<13 anos de idade). Um paciente será excluído deste estudo se paciente mulher estiver grávida ou amamentando; tiver recebido um fármaco investigacional dentro de 30 dias antes da inscrição no estudo; ou tiver uma condição médica, doença intercorrente séria ou outra circunstância extenuando que possa diminuir significantemente a obediência ao estudo.

Segurança

[01006] Terapia com CNP22 ou suas variantes será determinada ser segura se quaisquer reações de fármaco agudas ou crônicas significantes ocorrerem durante o curso do estudo. A administração a longo prazo do fármaco será determinada ser segura se quaisquer anormalidades significantes forem observadas nos exames clínicos, laboratórios clínicos ou outros estudos apropriados.

[01007] Foi mostrado que comparado com CNP22 do tipo selvagem, certas variantes de CNP da invenção são muito mais resistentes à degradação por NEP *in vitro*, têm meia-vida no plasma e biodisponibilidade muito mais longas em rato, estimulam um nível muito maior de produção de cGMP em ratos e/ou induzem um aumento significantemente maior em comprimento de osso longo e comprimento do corpo em camundongos acondroplásticos. Ainda, foi mostrado que tratamentos de regime de dose de duração curta com CNP22 são quase tão eficazes quanto tratamento com CNP22 contínuo na reversão de parada induzida por FGF2 de crescimento de condrócito *in vitro*. Esses resultados, dentre outros descritos aqui, demonstram que a utilidade de variantes de CNP da invenção no tratamento de condições ou dis-

túrbios responsivos a CNP tais como, por exemplo, distúrbios relacionados a osso e distúrbios de músculo liso vascular.

[01008] É compreendido que cada modalidade da invenção descrita aqui pode ser opcionalmente combinada com qualquer uma ou mais das outras modalidades descritas aqui. Cada literatura de patente e cada literatura de não patente mencionada aqui é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[01009] Várias modificações e variações na invenção, conforme mostrado nas modalidades e exemplos ilustrativos descritos aqui, são esperadas ocorrer àqueles versados na técnica. Consequentemente, apenas tais limitações como aparecem nas reivindicações apensas deve ser postas no relatório.

## REIVINDICAÇÕES

1. Variante de peptídeo natriurético tipo C (CNP), caracterizada pelo fato de que é selecionada do grupo consistindo em:

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID Nº: 145);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 182);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (SEQ ID NO: 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (SEQ ID NO: 192);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 181);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 191);

, e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 75)

opcionalmente em que a variante CNP é conjugada a uma porção selecionada de um ácido hidrofóbico e uma sequência de aminoácidos de 1 a 20 aminoácidos úteis no direcionamento ao osso.

2. Variante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende um grupo polimérico sintético acoplado à variante CNP.

3. Variante de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o grupo polimérico sintético compreende uma fração polimérica hidrofílica.

4. Variante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a fração polimérica hidrofílica compreende polietilenoglicol (PEG).

5. Variante de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o grupo polimérico sintético é acoplado através de um ligante hidrolisável.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante de CNP, como definida na reivindicação 1 a 5, e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitavel.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que é uma formulação liofilizada preparada a partir de uma formulação que compreende um tampão ácido cítrico/citrato ou um tampão ácido acético/acetato tendo um pH de 4 a 6.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a formulação liofilizada é preparada a partir de uma formulação que compreende ainda (a) um agente de ajuste da isotonicidade e/ou um agente de volume ou (b) um antioxidante.

9. Composição de acordo com a reivindicação 6 para tratamento de uma condição ou distúrbio responsivo a CNP, caracterizada pelo fato de que compreende:

um peptídeo CNP ou variante, em que a composição é administrada a um indivíduo e o nível de um biomarcador ou múltiplos marcadores associados a osso ou cartilagem no indivíduo são monitorados,

em que um aumento no nível de biomarcador monitorado associado a osso ou cartilagem indicam um efeito terapêutico do peptídeo CNP ou variante no indivíduo ou condição ou distúrbio, em que a variante de CNP é como definida na reivindicação 5.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o biomarcador associado a osso ou cartilagem são selecionados do grupo consistindo em CNP, cGMP, pró-peptídeos de colágeno tipo II e seus fragmentos, colágeno tipo II e seus fragmentos, osteocalcina, antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA),

pró-peptídeos de colágeno tipo I (PINP) e seus fragmentos, colágeno tipo I e seus fragmentos, sulfato de condroitina agrecano e fosfatase alcalina.

11. Variante de CNP, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou uma composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um distúrbio relacionado a osso ou displasia esquelética selecionada do grupo consistindo em acondroplasia, hipocondroplasia, estatura baixa, nanismo e acondroplasia homozigota.

12. Variante de CNP ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o distúrbio relacionado a osso ou displasia esquelética é acondroplasia.

13. Variante de CNP, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou uma composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um distúrbio do músculo liso vascular selecionado do grupo consistindo em hipertensão, restenose, arteriosclerose, falência cardíaca descompensada aguda, falência cardíaca congestiva, edema cardíaco, nafredema, edema hepático, insuficiência renal aguda e insuficiência renal crônica.

14. Método para produção recombinante de uma variante de CNP, caracterizado pelo fato de que compreende cultura em um meio de uma célula hospedeira compreendendo um primeiro polinucleotídeo codificando um polipeptideo variante de CNP ligado a um segundo polinucleotídeo codificando um peptídeo ou proteína clivável sob condições que resultam em expressão de um polipeptídeo de fusão codificado pelos polinucleotídeos, em que o polipeptídeo de fusão compreende um polipeptídeo variante de CNP diretamente ligado ao peptídeo ou proteína clivável ou indiretamente ligado ao mesmo atra-

vés de um ligante, em que a variante CNP é selecionada do grupo consistindo em:

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 145);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 182);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (SEQ ID NO: 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (SEQ ID NO: 192);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (SEQ ID NO: 181);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI-GSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 191);

; e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (SEQ ID NO: 75).

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é transformada com um vetor de expressão compreendendo o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo variante de CNP ligado ao polinucleotídeo codificando o polipeptídeo ou proteína clivável.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o peptídeo ou proteína clivável é selecionado do grupo consistindo em marcadores de histidina, fator de transcrição humano TAF12, fragmentos de TAF12, domínio de dobra de histona de TAF12, mutantes de TAF12 e seus fragmentos, TAF12(C/A), TAF12(D/E), TAF12(4D/4E), TAF12(6D/6E), TAF12(10D/10E), TAF12(C/A & D/E), TAF12(C/A & 4D/4E), TAF12(C/A & 6D/6E), TAF12(C/A & 10D/10E), cetoesteroide isomerase, proteína de ligação

à maltose, β-galactosidase, glutationa-S-transferase, tiorredoxina, domínio de ligação à quitina, BMP-2, mutantes de BMP-2, BMP2(C/A) e mutantes e seus fragmentos.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é bacteriana.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 17, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de fusão é expresso como uma proteína solúvel ou como um corpo de inclusão.

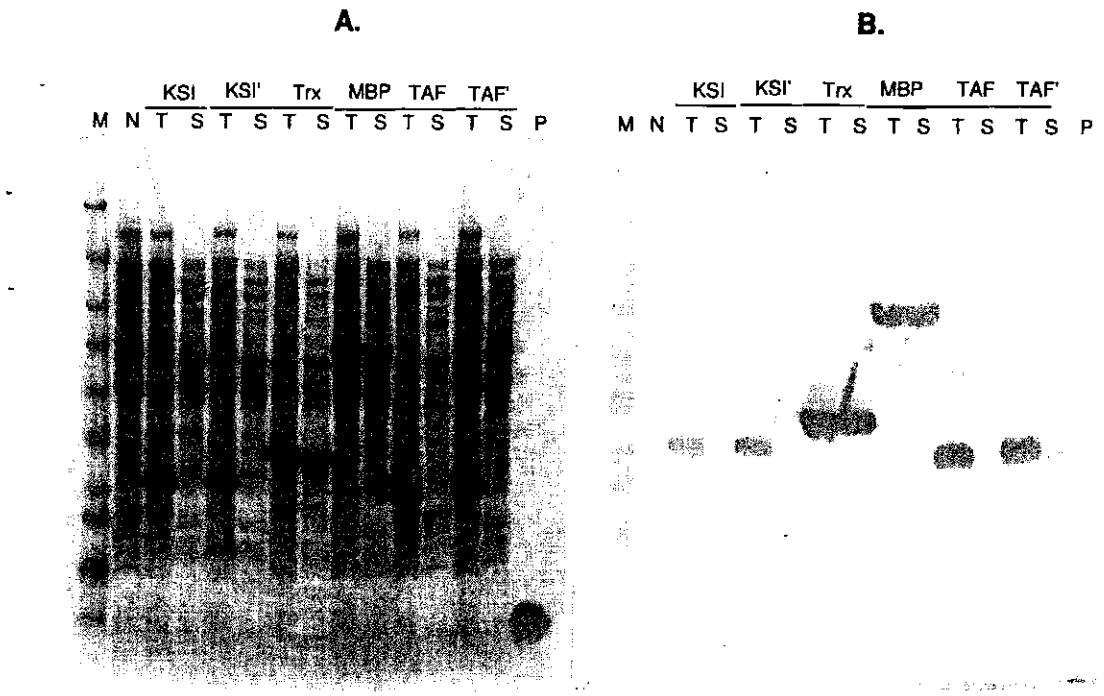
19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolamento do polipeptídeo de fusão expresso da célula hospedeiro ou meio de cultura.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende ainda contato do polipeptídeo de fusão isolado com um agente de clivagem selecionado do grupo consistindo em ácido fórmico, brometo de cianogênio (CNBr), hidroxilamina, proteína de autoclivagem, Fator Xa, enterocinase, ProTEV e protease SUMO.

21. Uso de uma variante de CNP, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição para aumentar o crescimento de ossos longos em um indivíduo em necessidade do mesmo, onde o crescimento de ossos longos é aumentado.

22. Uso de uma variante de CNP, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição para aumentar o crescimento de ossos longos ou tratar acondroplasia, hipocondroplasia, estatura baixa, nanismo ou acondroplasia homozigota em um indivíduo em necessidade do mesmo.

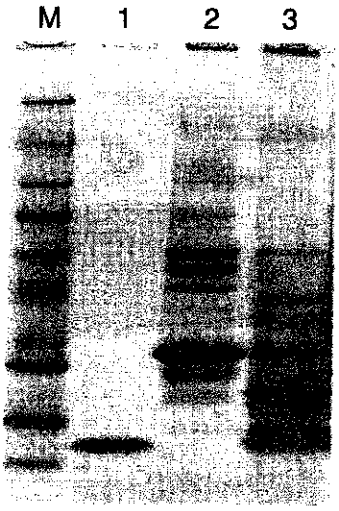
FIG. 1




Tingimento com Coomassie blue

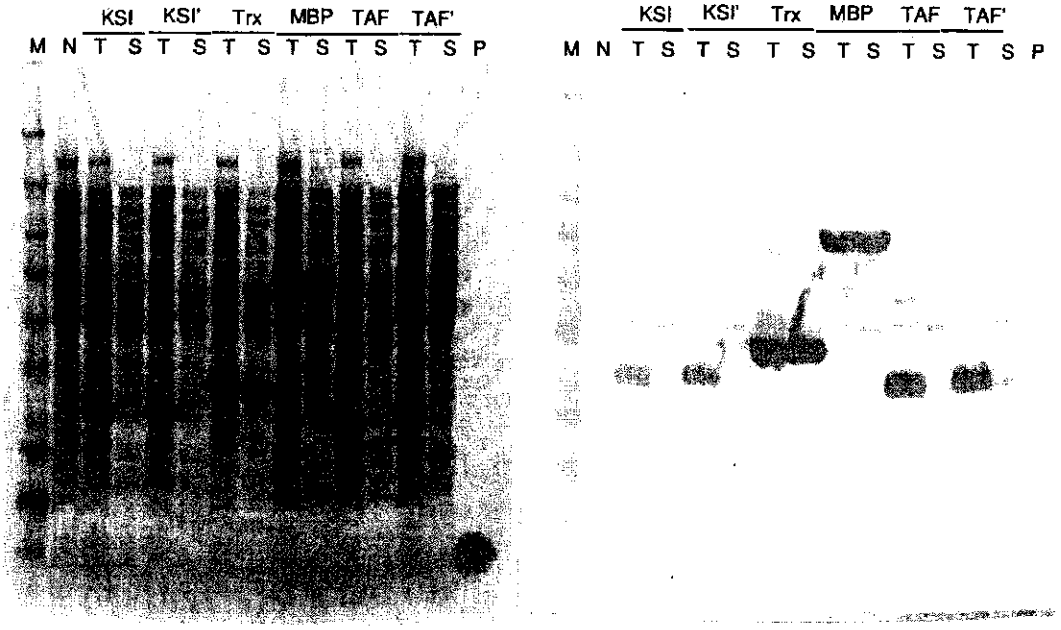
*Western blot* com anticorpo anti-CNP

FIG. 2



# FIG. 3

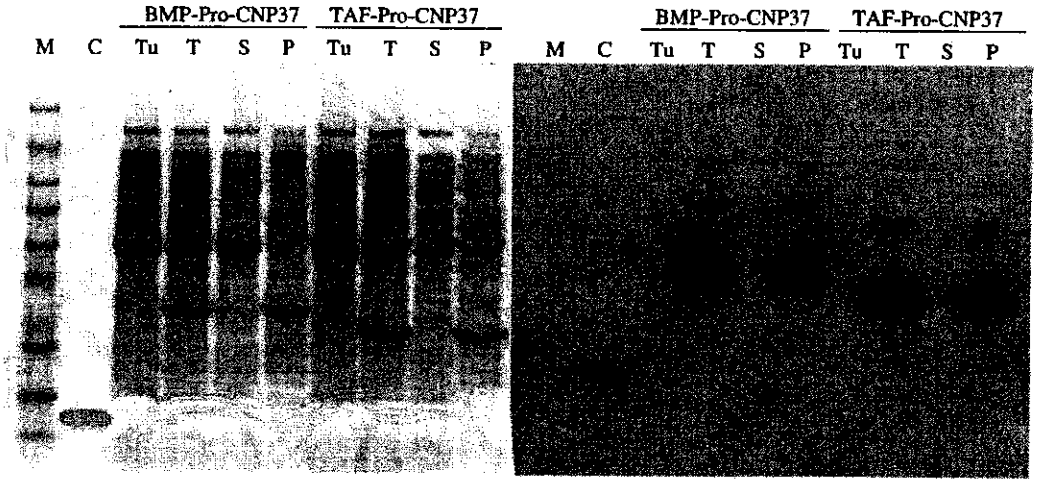
**A.**




Tingimento com Coomassie blue

*Western blot* com anticorpo anti-CNP

**B.**

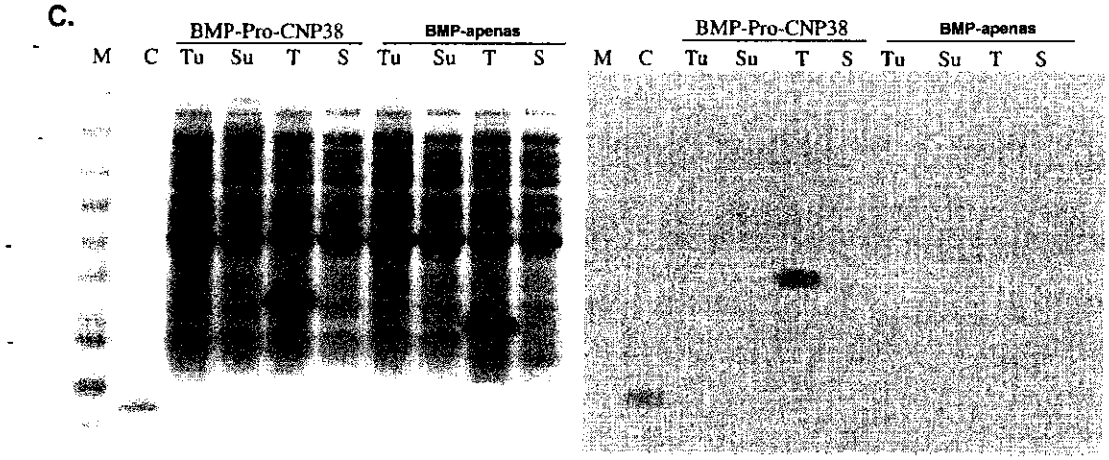



Tingimento com Coomassie blue

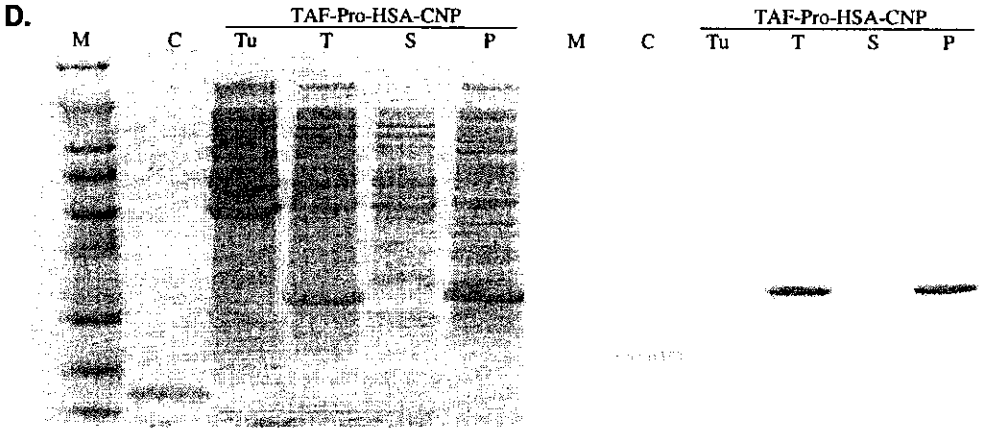
*Western blot* com anticorpo anti-CNP

FIG. 3 continuação

C.




D.




E.

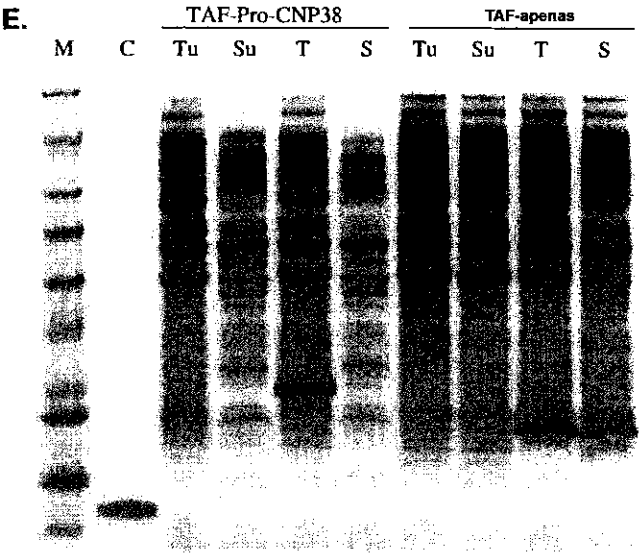


FIG. 4

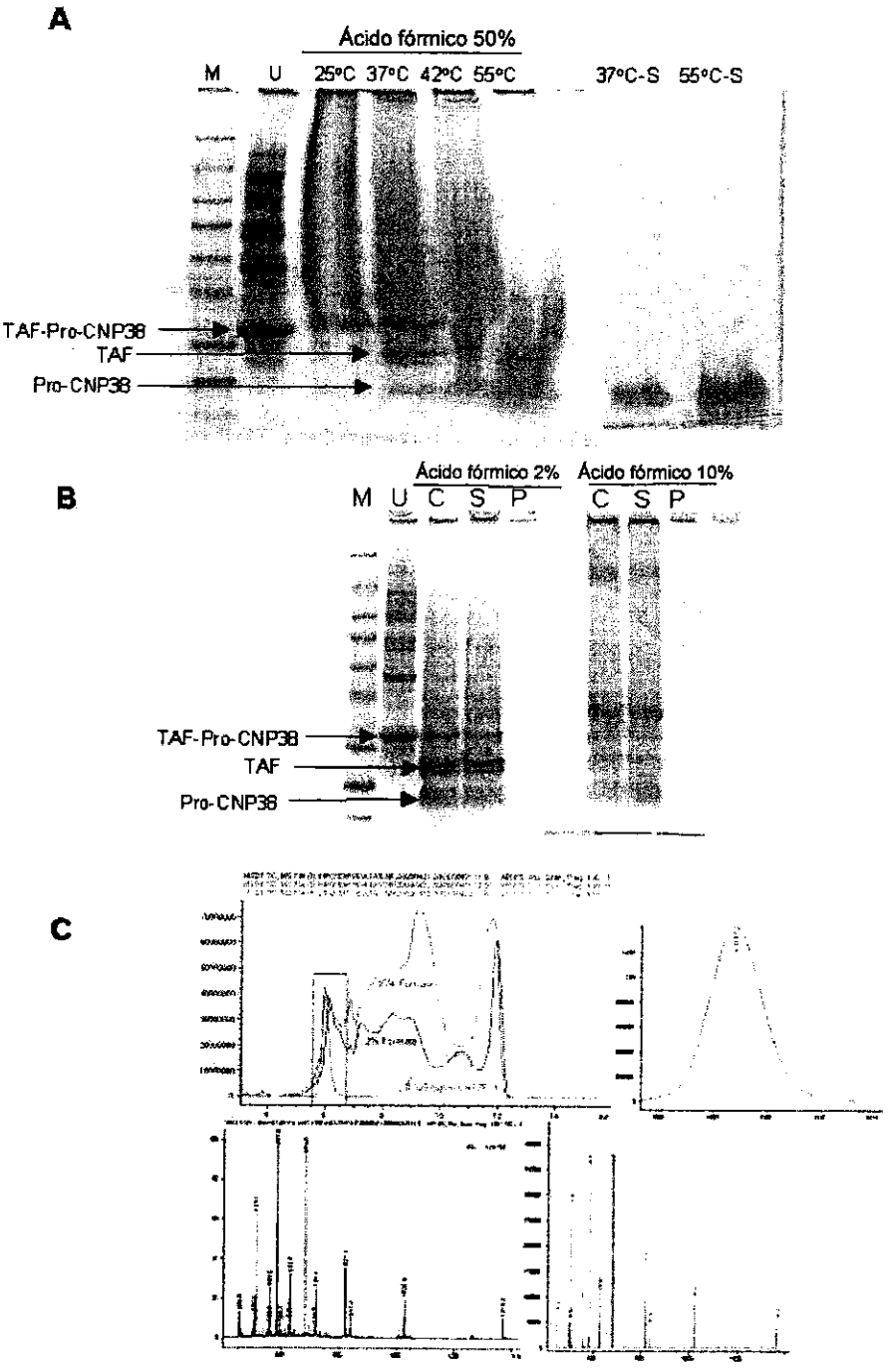

A
Ácido fórmico 50%
M
U
25°C
37°C
42°C
55°C
37°C-S
55°C-S
TAF-Pro-CNP38
TAF
Pro-CNP38
B
Ácido fórmico 2%
Ácido fórmico 10%
M
U
C
S
P
C
S
P
TAF-Pro-CNP38
TAF
Pro-CNP38
C

FIG. 5

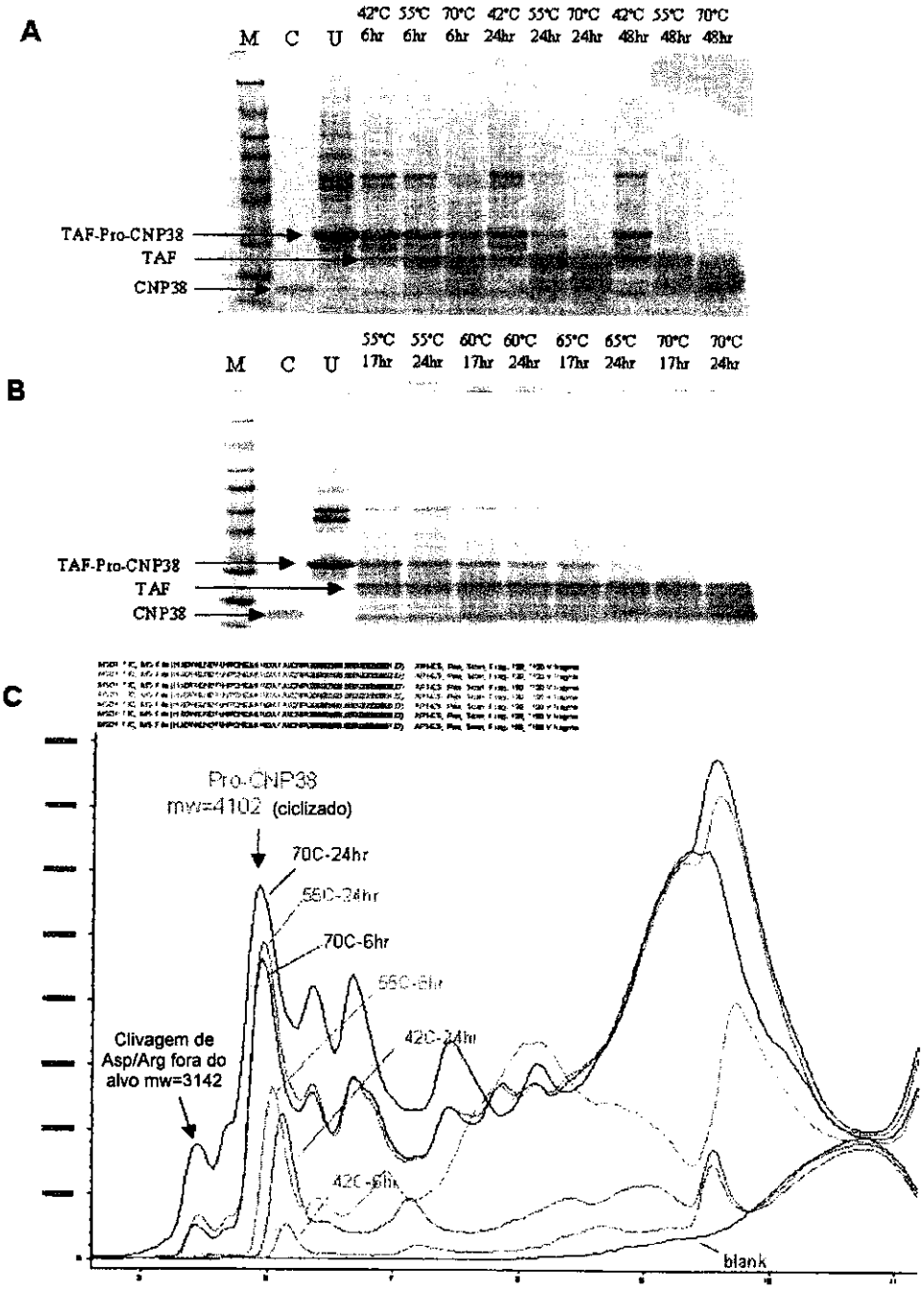

A
M C U 42°C 6hr 55°C 6hr 70°C 6hr 42°C 24hr 55°C 24hr 70°C 24hr 42°C 48hr 55°C 48hr 70°C 48hr
TAF-Pro-CNP38
TAF
CNP38
B
M C U 55°C 17hr 55°C 24hr 60°C 17hr 60°C 24hr 65°C 17hr 65°C 24hr 70°C 17hr 70°C 24hr
TAF-Pro-CNP38
TAF
CNP38
C
Pro-CNP38
mw=4102 (ciclizado)
70C-24hr
56C-24hr
70C-6hr
55C-6hr
42C-24hr
Clivagem de
Asp/Arg fora do
alvo mw=3142
42C-6hr
blank

FIG. 6

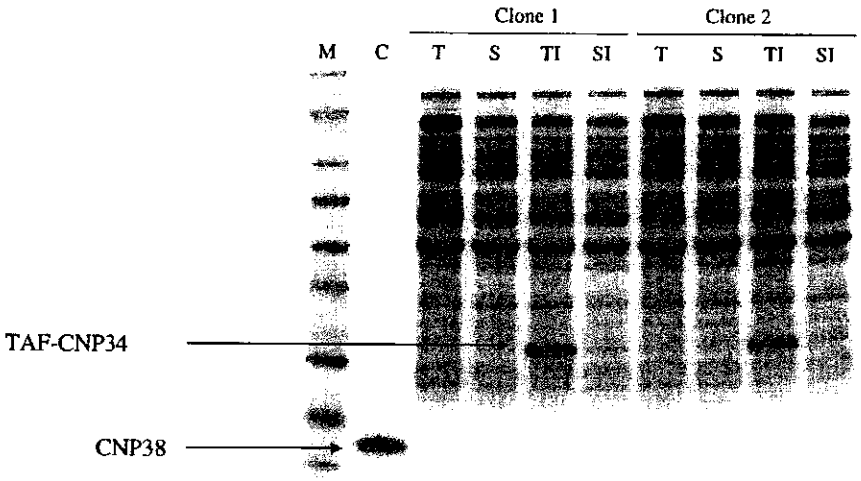

Clone 1
Clone 2
M
C
T
S
TI
SI
T
S
TI
SI
TAF-CNP34
CNP38

FIG. 7

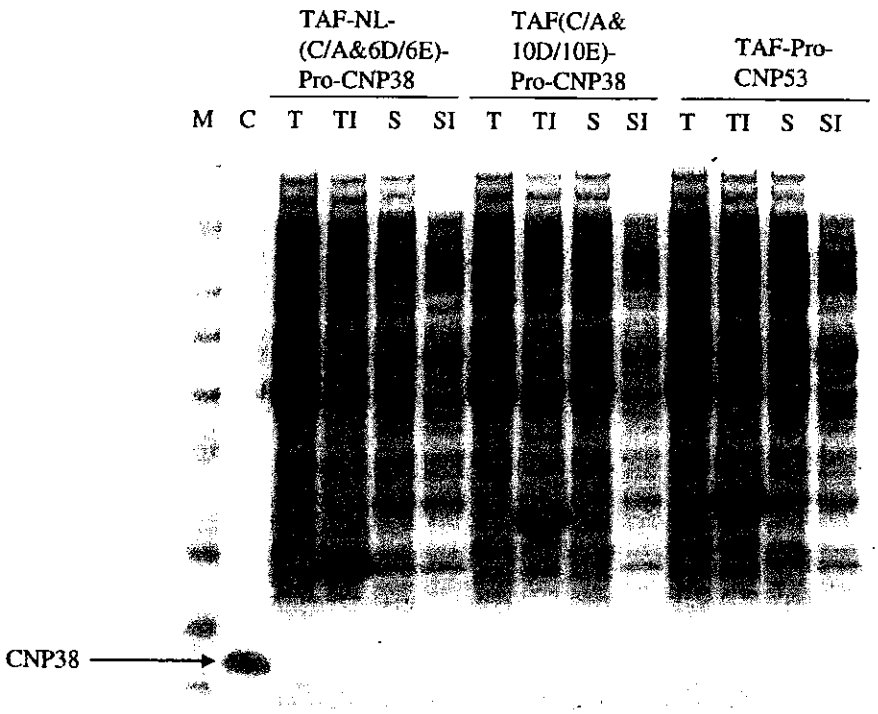

TAF-NL-(C/A&6D/6E)-Pro-CNP38
TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38
TAF-Pro-CNP53
M
C
T
TI
S
SI
T
TI
S
SI
T
TI
S
SI
CNP38

FIG. 8

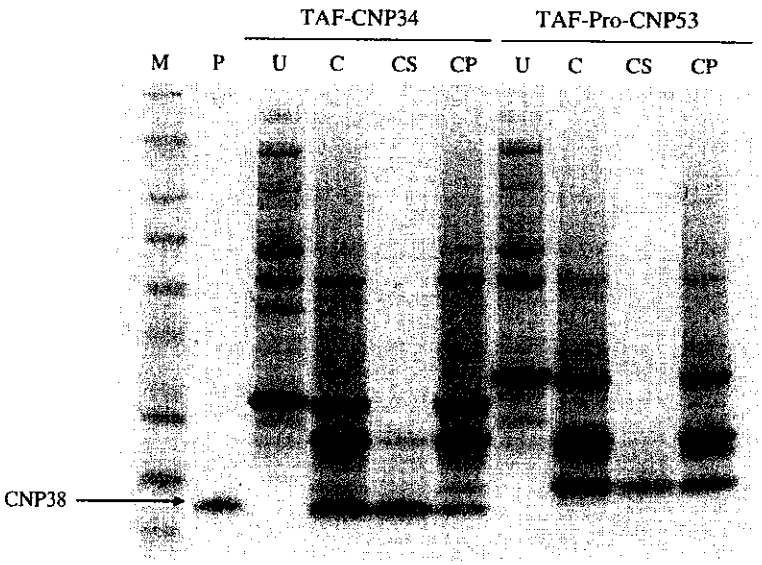



FIG. 9

Massa monoisotópica de CNP34 calc. = 3553,88

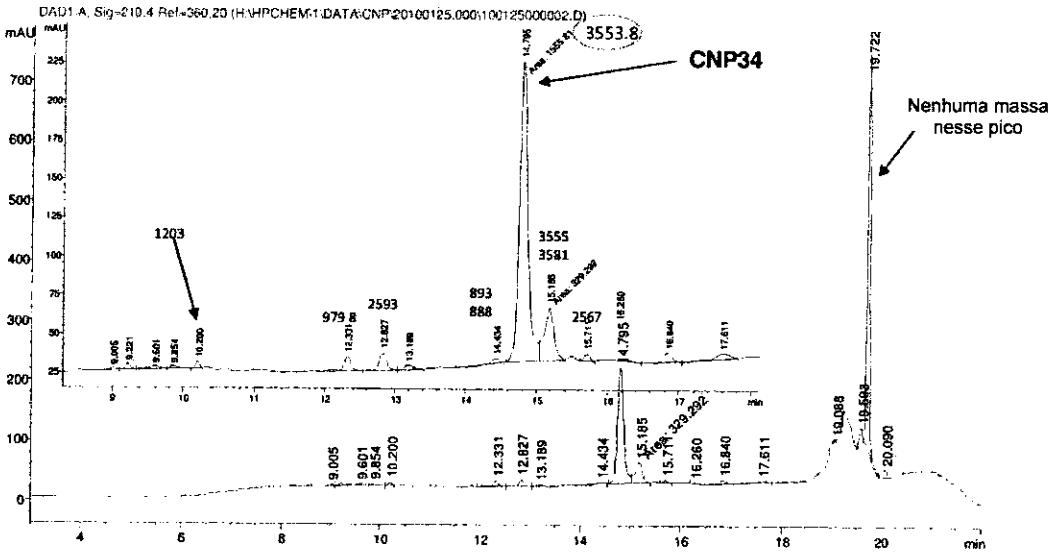


FIG. 10

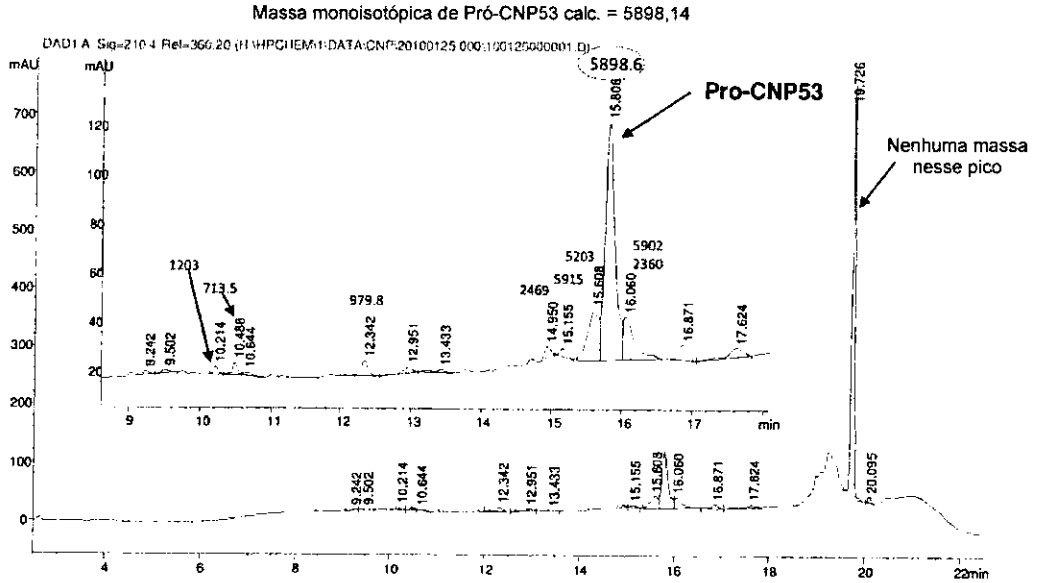

Massa monoisotópica de Pró-CNP53 calc. = 5898,14
mAU
5898.6
Pro-CNP53
Nenhuma massa nesse pico
1203
713.5
979.8
2469
5915
5203
5902
2360
min
22min

FIG. 11

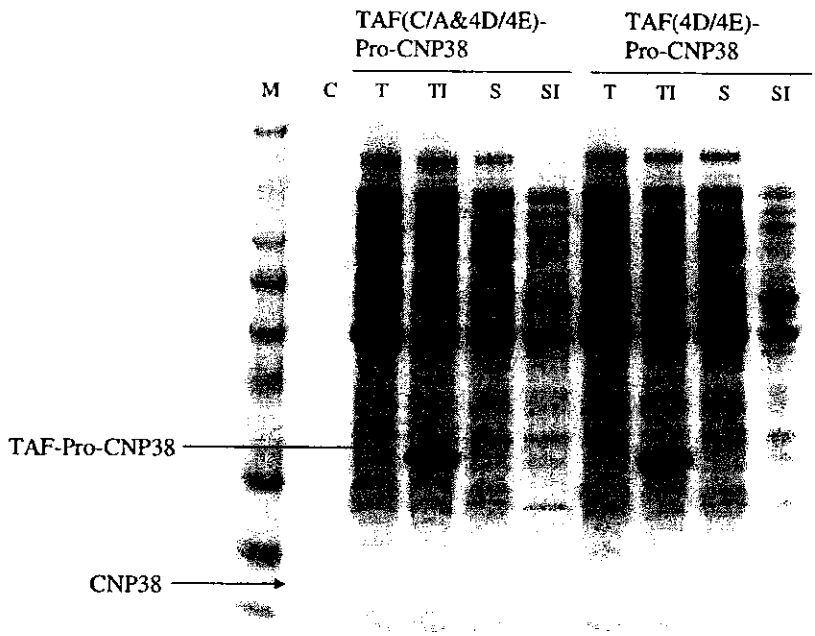

TAF(C/A&4D/4E)-Pro-CNP38
TAF(4D/4E)-Pro-CNP38
M
C
T
TI
S
SI
T
TI
S
SI
TAF-Pro-CNP38
CNP38

FIG. 12

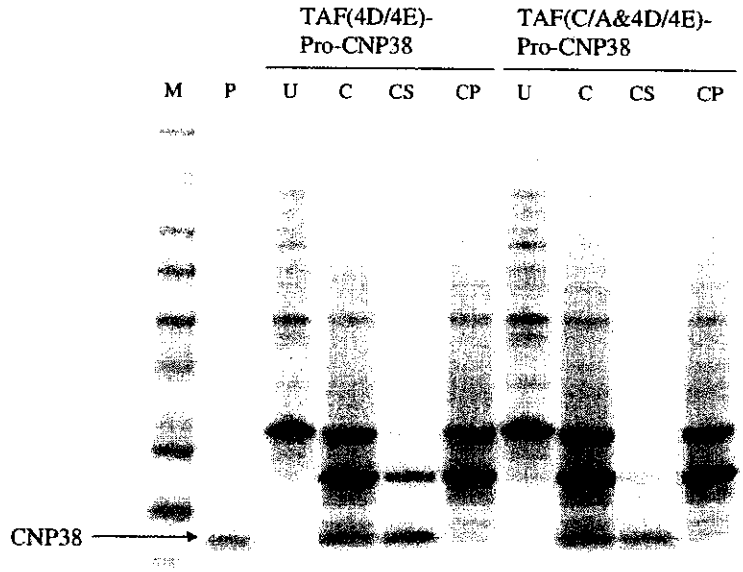

TAF(4D/4E)-Pro-CNP38
TAF(C/A&4D/4E)-Pro-CNP38
M
P
U
C
CS
CP
U
C
CS
CP
CNP38

FIG. 13

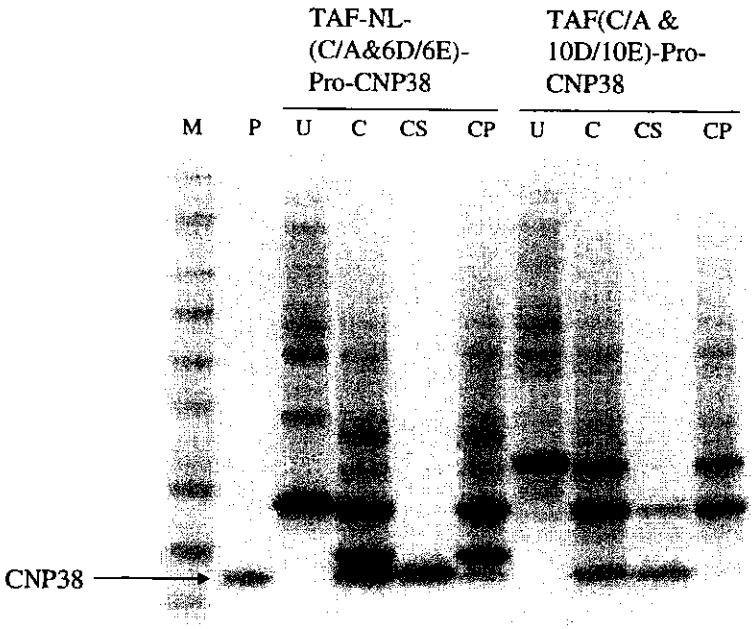

TAF-NL-(C/A&6D/6E)-Pro-CNP38
TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38
M
P
U
C
CS
CP
U
C
CS
CP
CNP38

FIG. 14

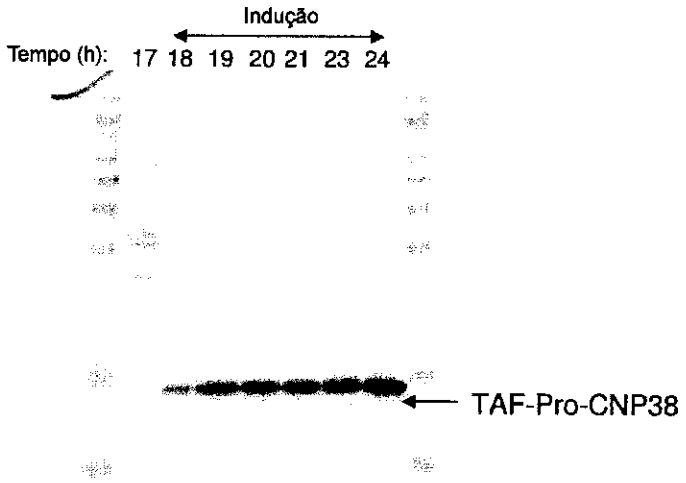

Indução
Tempo (h): 17 18 19 20 21 23 24
TAF-Pro-CNP38

FIG. 15

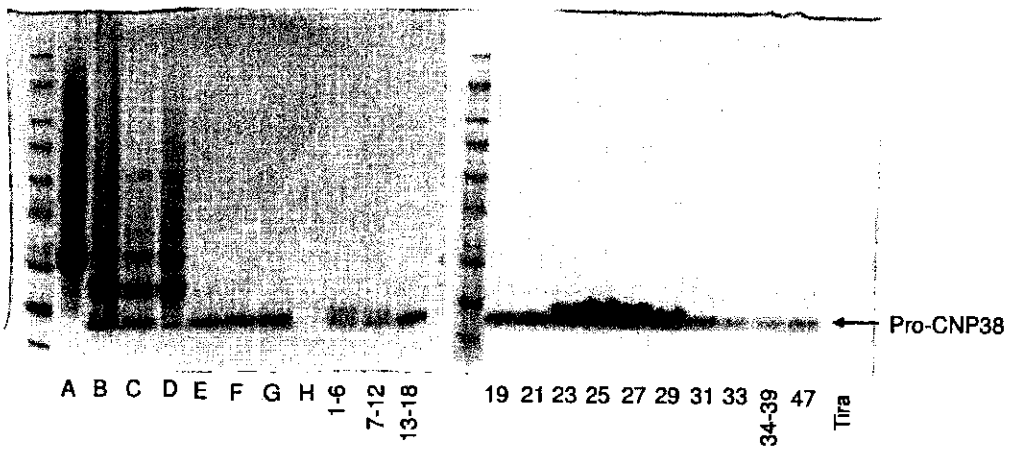

Pro-CNP38
A B C D E F G H 1-6 7-12 13-18 19 21 23 25 27 29 31 33 34-39 47 Tira
Frações de Eluato de Sepharose SP

FIG. 16

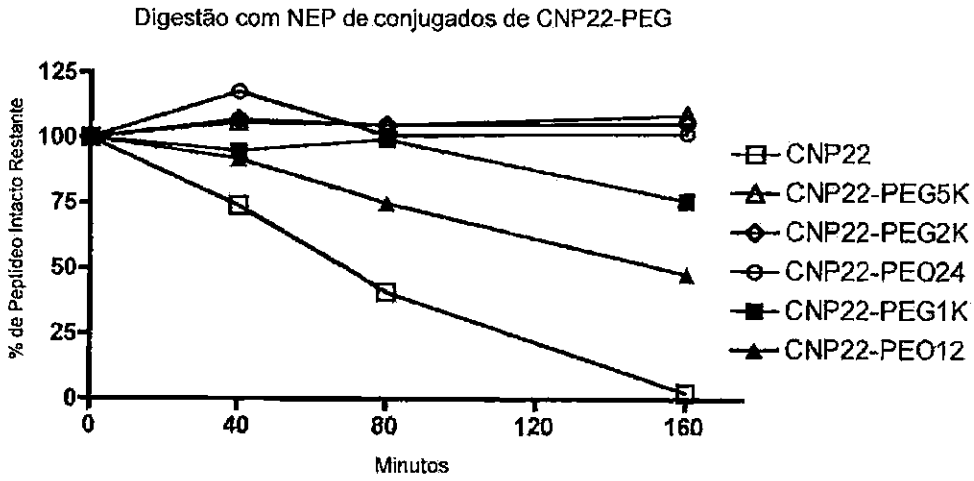

Digestão com NEP de conjugados de CNP22-PEG
% de Peptídeo Intacto Restante
125
100
75
50
25
0
0
40
80
120
160
Minutos
CNP22
CNP22-PEG5K
CNP22-PEG2K
CNP22-PEO24
CNP22-PEG1K
CNP22-PEO12

FIG. 17

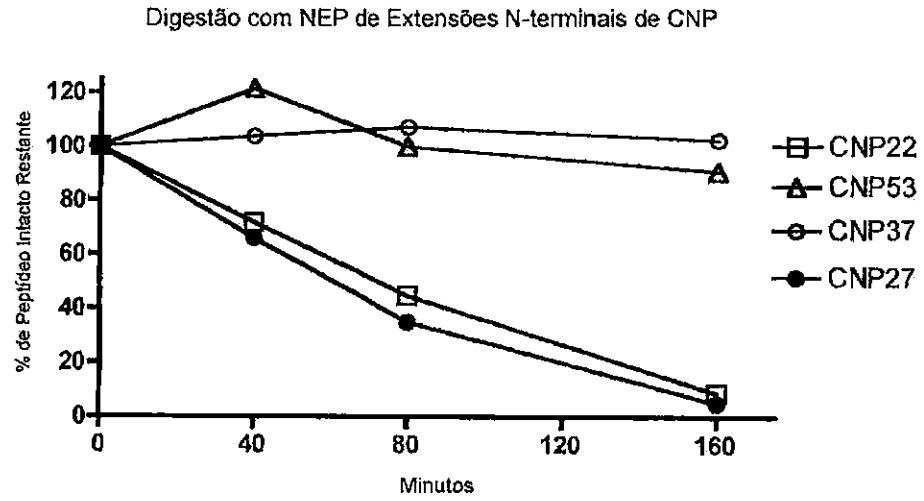

Digestão com NEP de Extensões N-terminais de CNP
% de Peptídeo Intacto Restante
120
100
80
60
40
20
0
0
40
80
120
160
Minutos
CNP22
CNP53
CNP37
CNP27

FIG. 18

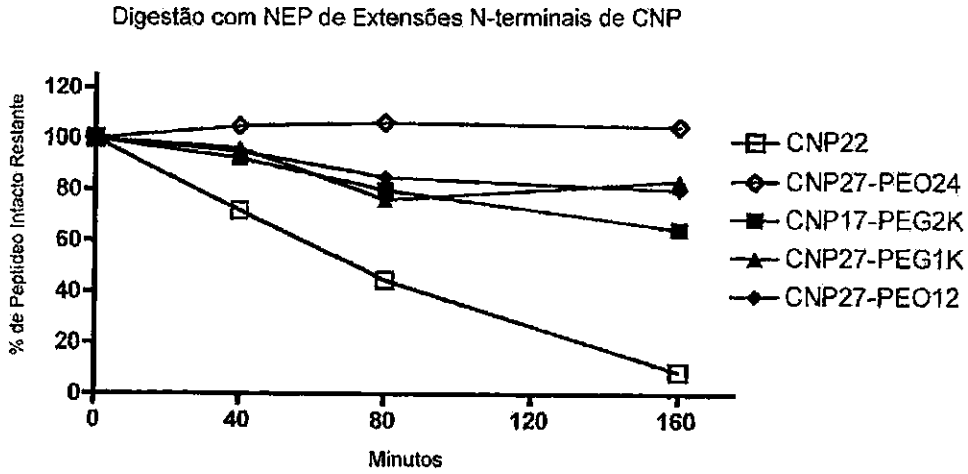

Digestão com NEP de Extensões N-terminais de CNP
% de Peptídeo Intacto Restante
120
100
80
60
40
20
0
0
40
80
120
160
Minutos
CNP22
CNP27-PEO24
CNP17-PEG2K
CNP27-PEG1K
CNP27-PEO12

FIG. 19

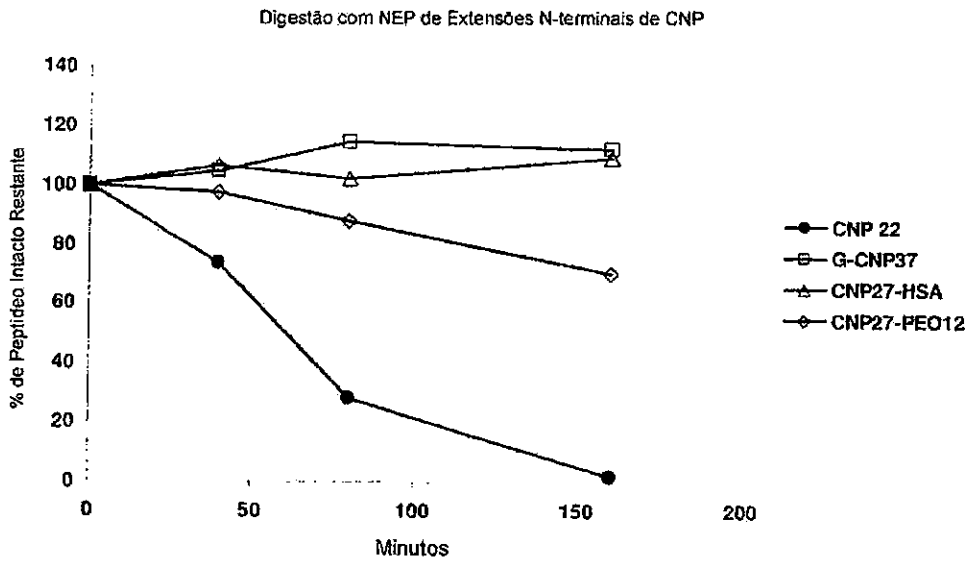

Digestão com NEP de Extensões N-terminais de CNP
% de Peptídeo Intacto Restante
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
Minutos
CNP 22
G-CNP37
CNP27-HSA
CNP27-PEO12

FIG. 20

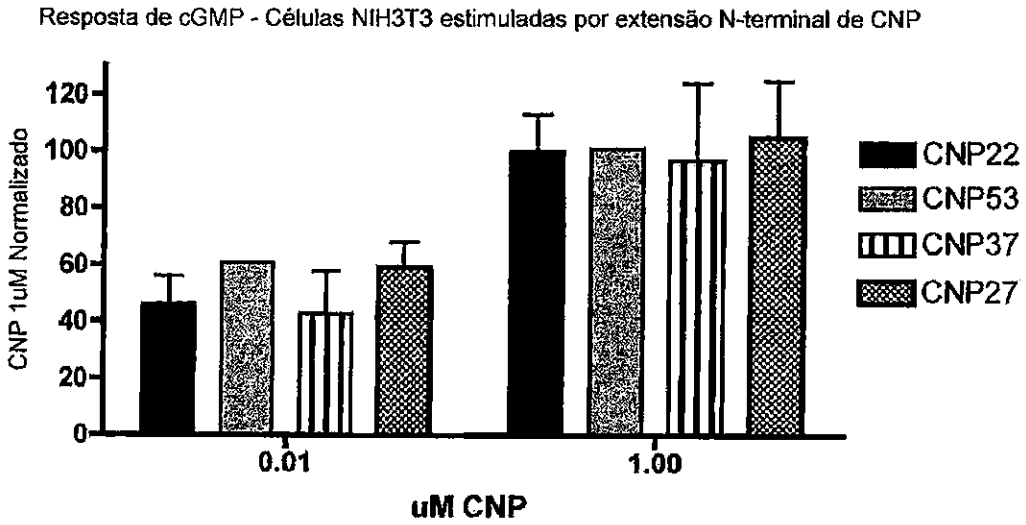

Resposta de cGMP - Células NIH3T3 estimuladas por extensão N-terminal de CNP
CNP 1uM Normalizado
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1.00
uM CNP
CNP22
CNP53
CNP37
CNP27

FIG. 21

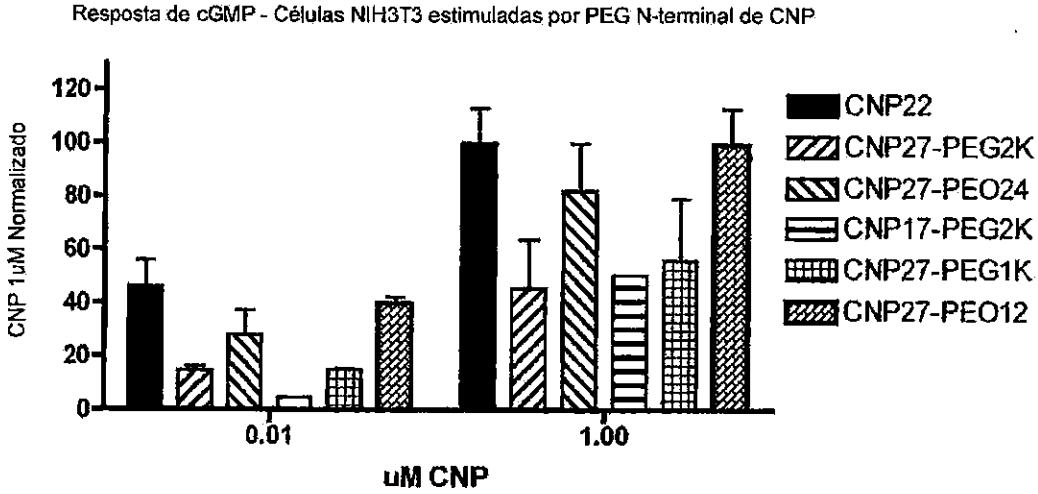

Resposta de cGMP - Células NIH3T3 estimuladas por PEG N-terminal de CNP
CNP 1uM Normalizado
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1.00
uM CNP
CNP22
CNP27-PEG2K
CNP27-PEO24
CNP17-PEG2K
CNP27-PEG1K
CNP27-PEO12

FIG. 22

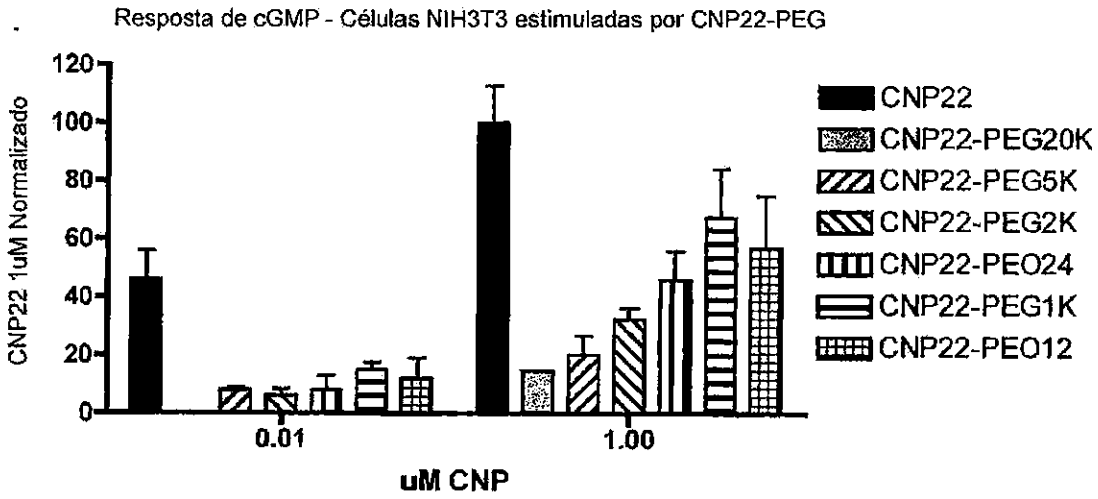

Resposta de cGMP - Células NIH3T3 estimuladas por CNP22-PEG
CNP22 1uM Normalizado
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1.00
uM CNP
CNP22
CNP22-PEG20K
CNP22-PEG5K
CNP22-PEG2K
CNP22-PEO24
CNP22-PEG1K
CNP22-PEO12

FIG. 23

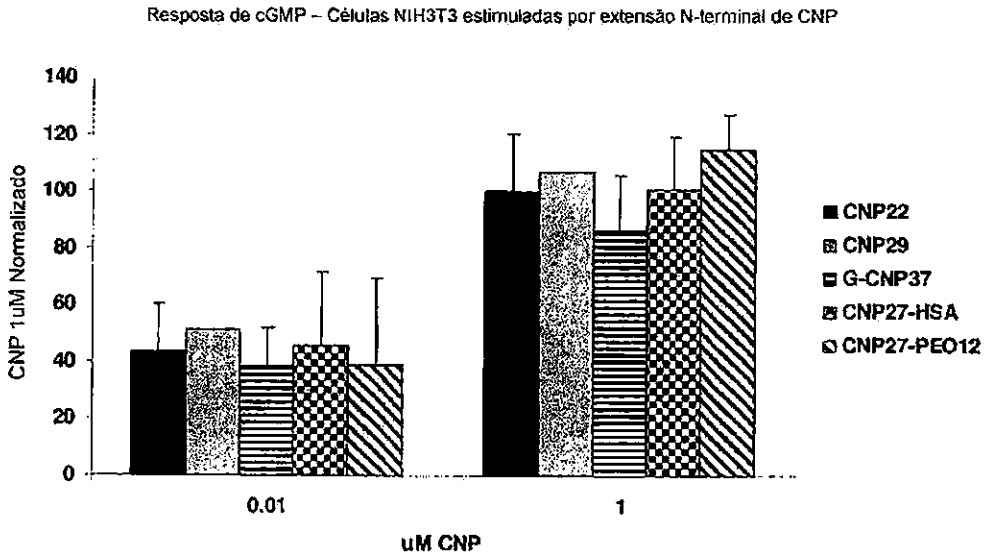
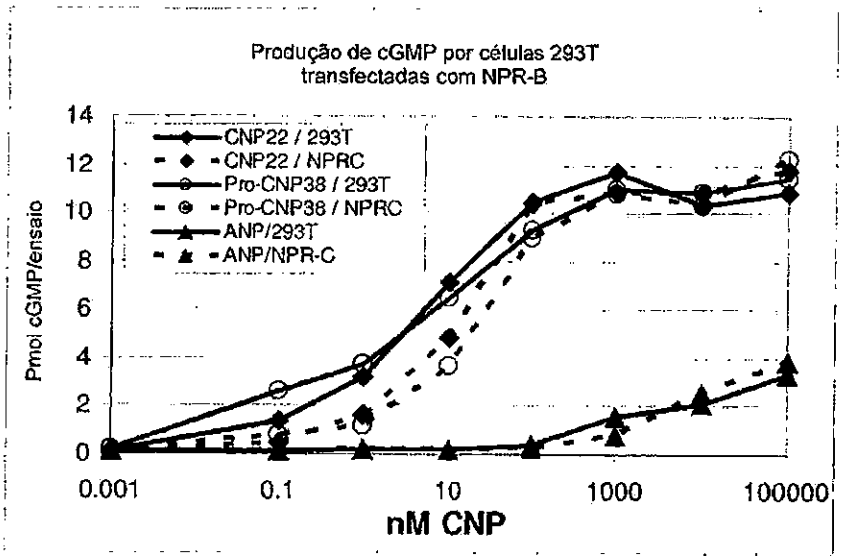

Resposta de cGMP – Células NIH3T3 estimuladas por extensão N-terminal de CNP
CNP 1uM Normalizado
140
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1
uM CNP
CNP22
CNP29
G-CNP37
CNP27-HSA
CNP27-PEO12

FIG. 24

A.


Produção de cGMP por células 293T
transfectadas com NPR-B
Pmol cGMP/ensaio
14
12
10
8
6
4
2
0
CNP22 / 293T
CNP22 / NPRC
Pro-CNP38 / 293T
Pro-CNP38 / NPRC
ANP/293T
ANP/NPR-C
0.001
0.1
10
1000
100000
nM CNP

B.

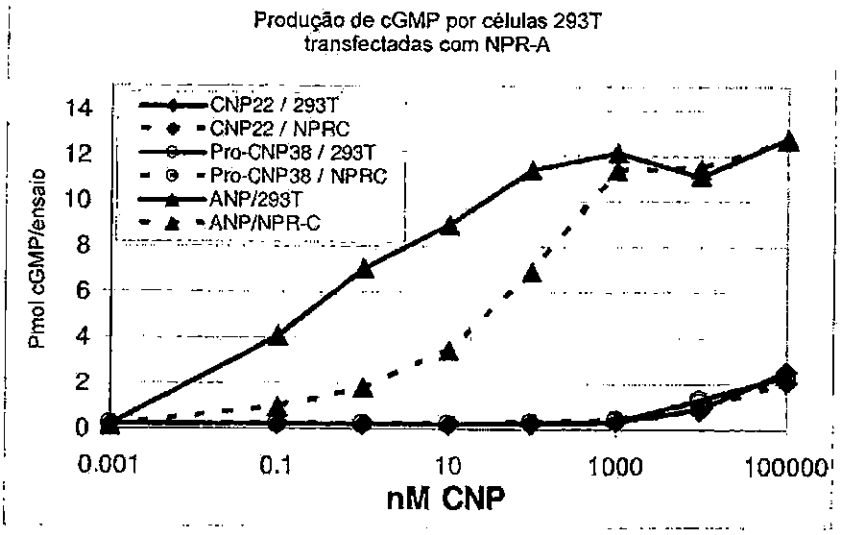
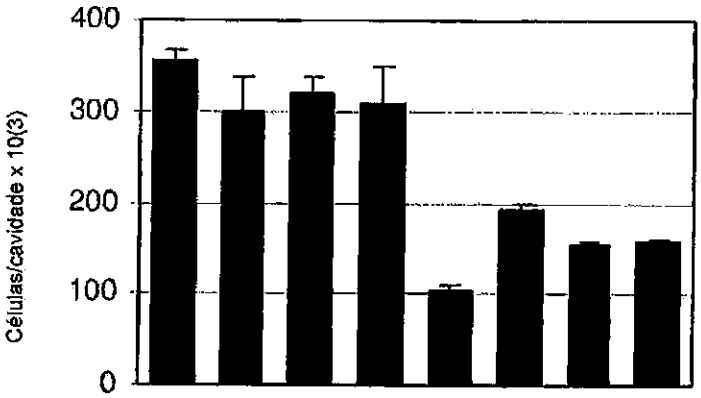

Produção de cGMP por células 293T
transfectadas com NPR-A
Pmol cGMP/ensaio
14
12
10
8
6
4
2
0
CNP22 / 293T
CNP22 / NPRC
Pro-CNP38 / 293T
Pro-CNP38 / NPRC
ANP/293T
ANP/NPR-C
0.001
0.1
10
1000
100000
nM CNP

FIG. 25




Barras da esquerda para a direita:

| | |
|---|---|
| 1 | Controle (sem CNP22, sem FGF2) |
| 2 | CNP22 (0,2 uM) contínuo |
| 3 | CNP22 (0,2 uM) 1 h uma vez por dia |
| 4 | CNP22 (0,2 uM) 2 h uma vez por dia |
| 5 | FGF2 (5 ng/mL) contínuo |
| 6 | FGF2 + CNP22 (0,2 uM) contínuo |
| 7 | FGF2 + CNP22 (0,2 uM) 1 h por dia |
| 8 | FGF2 + CNP22 (0,2 uM) 2 h por dia |

FIG. 26

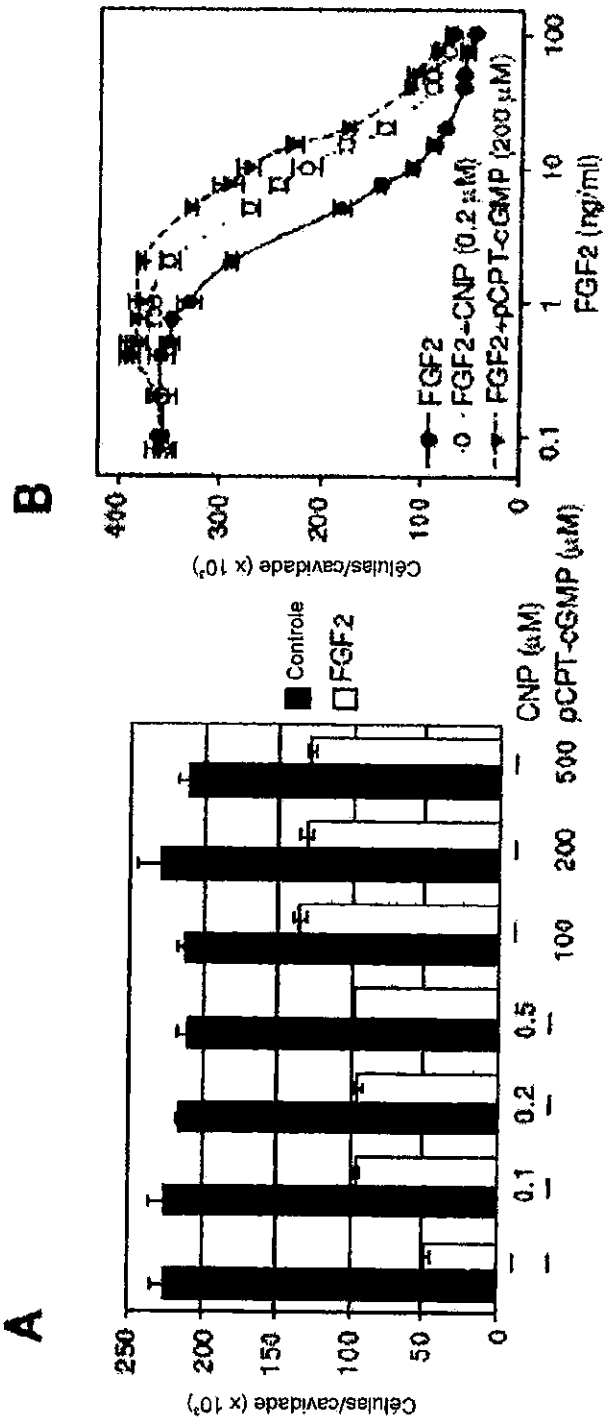

A
Células/cavidade (x 10⁴)
250
200
150
100
50
0
Controle
FGF2
—
0,1
0,2
0,5
100
200
500
CNP (µM)
pCPT-cGMP (µM)
B
Células/cavidade (x 10⁴)
400
300
200
100
0
FGF2
FGF2+CNP (0,2 µM)
FGF2+pCPT-cGMP (200 µM)
0,1
1
10
100
FGF2 (ng/ml)

FIG. 27

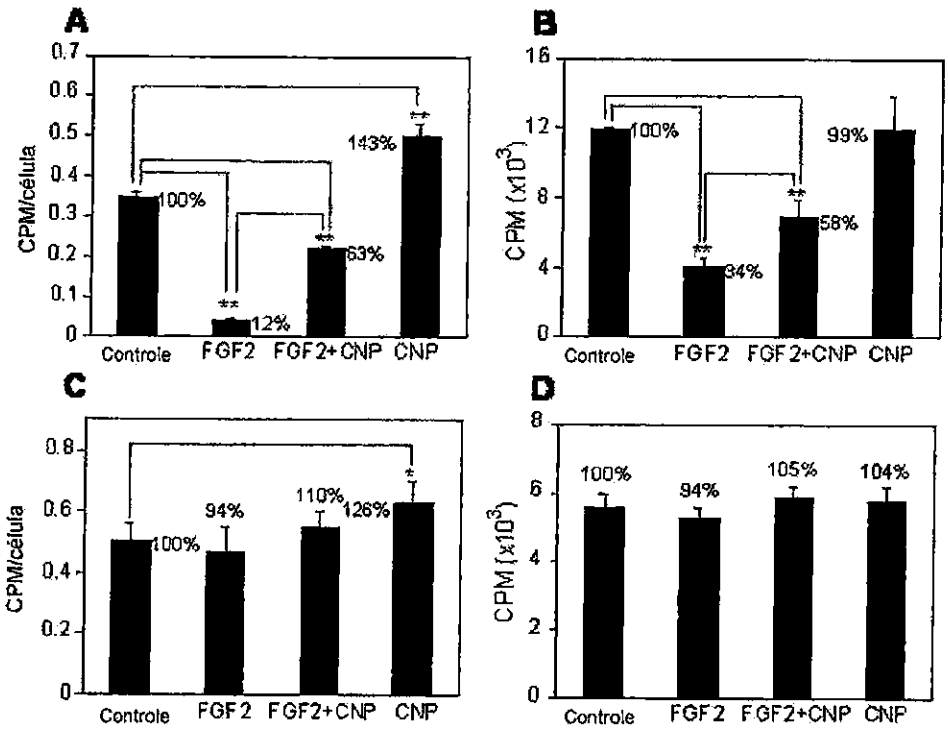

A
CPM/célula
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
100%
12%
63%
143%
**
Controle
FGF2
FGF2+CNP
CNP
B
CPM (x10³)
16
12
8
4
0
100%
94%
58%
99%
**
Controle
FGF2
FGF2+CNP
CNP
C
CPM/célula
0.8
0.6
0.4
0.2
0
100%
94%
110%
126%
*
Controle
FGF2
FGF2+CNP
CNP
D
CPM (x10³)
8
6
4
2
0
100%
94%
105%
104%
Controle
FGF2
FGF2+CNP
CNP

FIG. 28

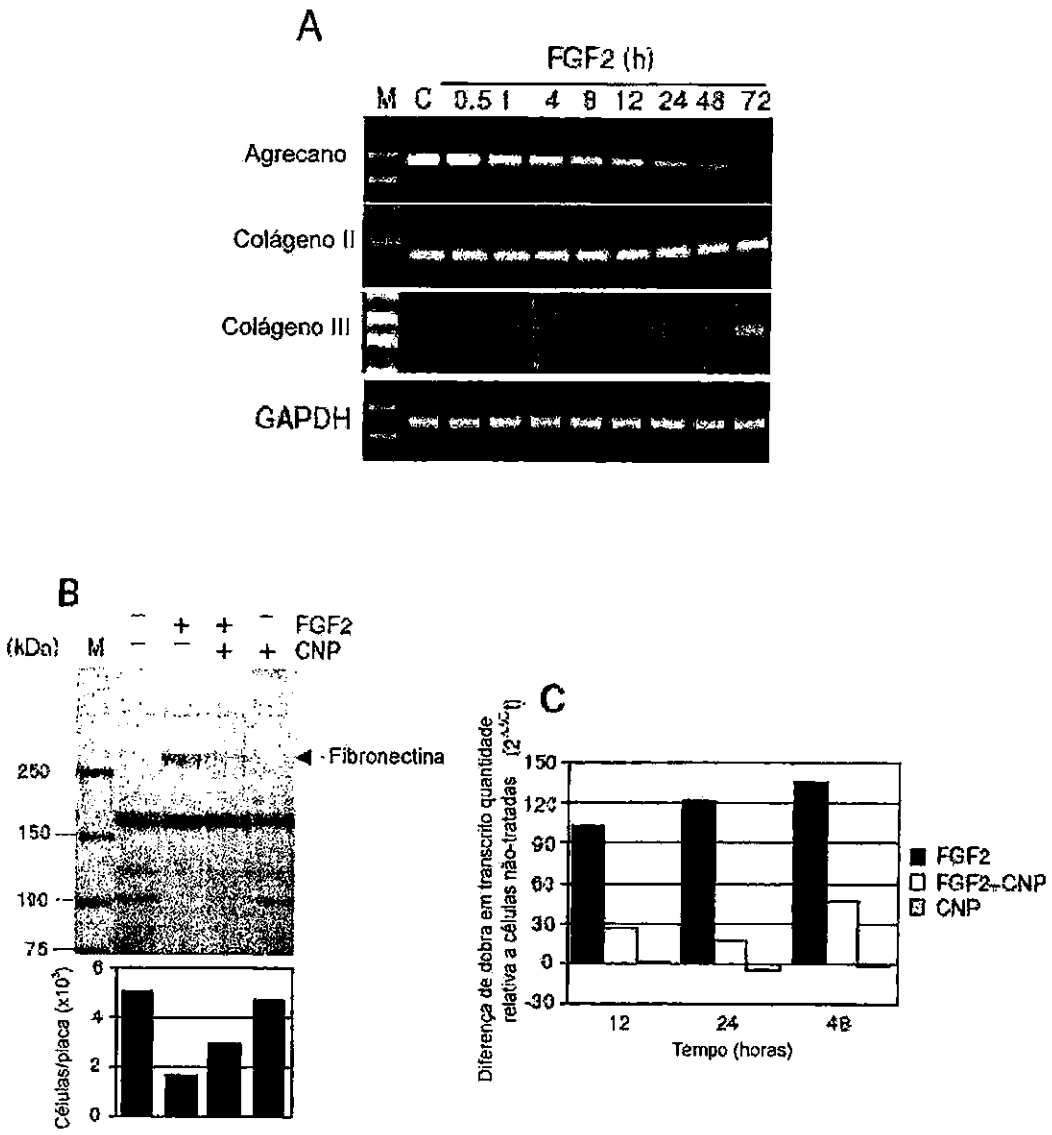

A
FGF2 (h)
M C 0.5 1 4 8 12 24 48 72
Agrecano
Colágeno II
Colágeno III
GAPDH
B
(kDa) M
FGF2
CNP
250
150
100
75
Fibronectina
Células/placa (x10³)
6
4
2
0
C
Diferença de dobra em transcrito quantidade relativa a células não-tratadas
150
120
90
60
30
0
-30
12
24
48
Tempo (horas)
FGF2
FGF2+CNP
CNP

FIG. 29

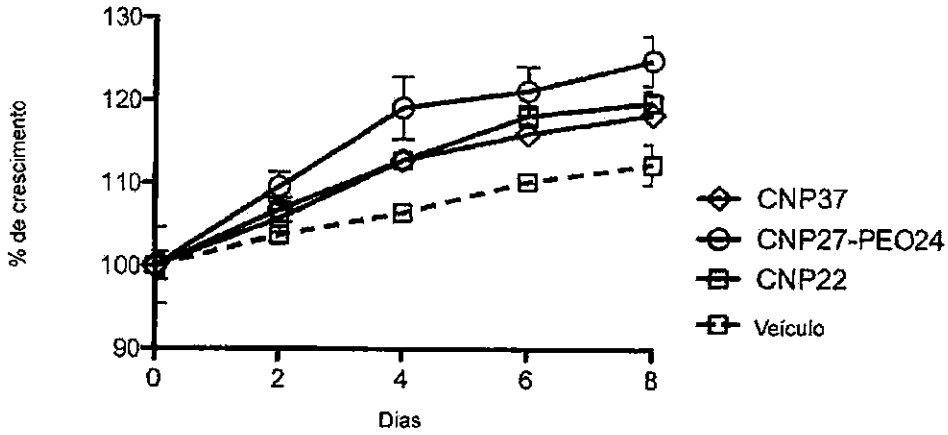

130
120
110
100
90
% de crescimento
0
2
4
6
8
Dias
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
Veículo

FIG. 30

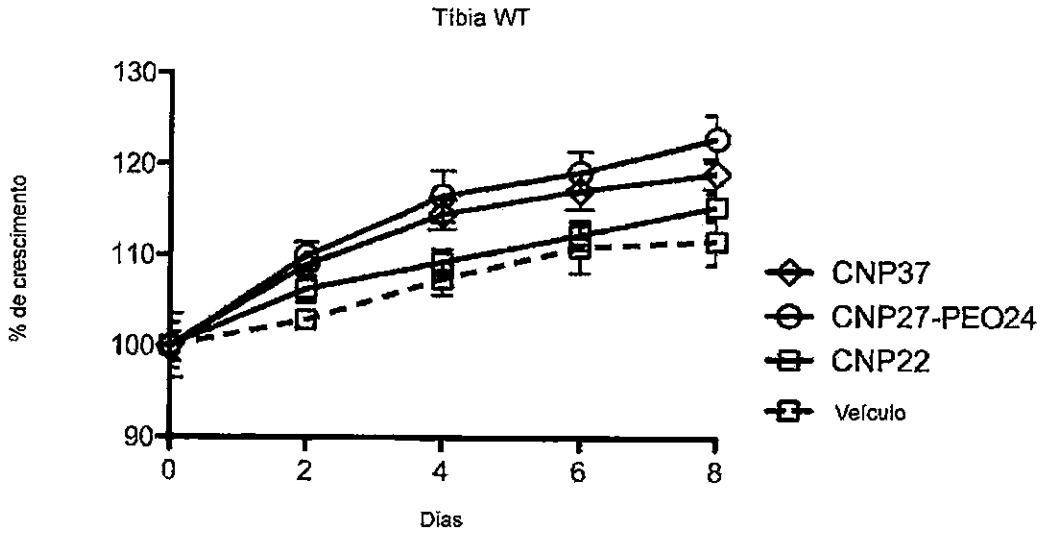

Tíbia WT
130
120
110
100
90
% de crescimento
0
2
4
6
8
Dias
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
Veículo

FIG. 31

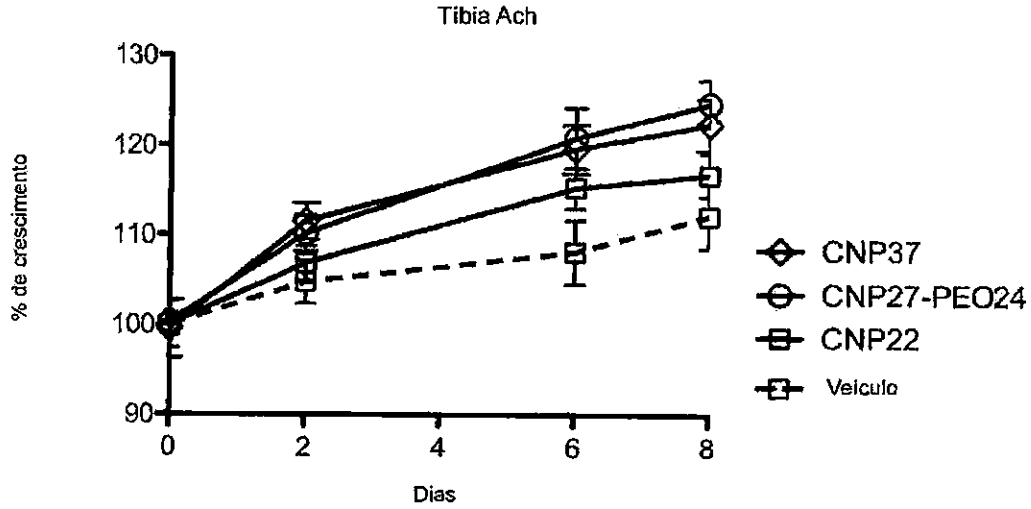

Tibia Ach
% de crescimento
130
120
110
100
90
0
2
4
6
8
Dias
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
Veículo

FIG. 32

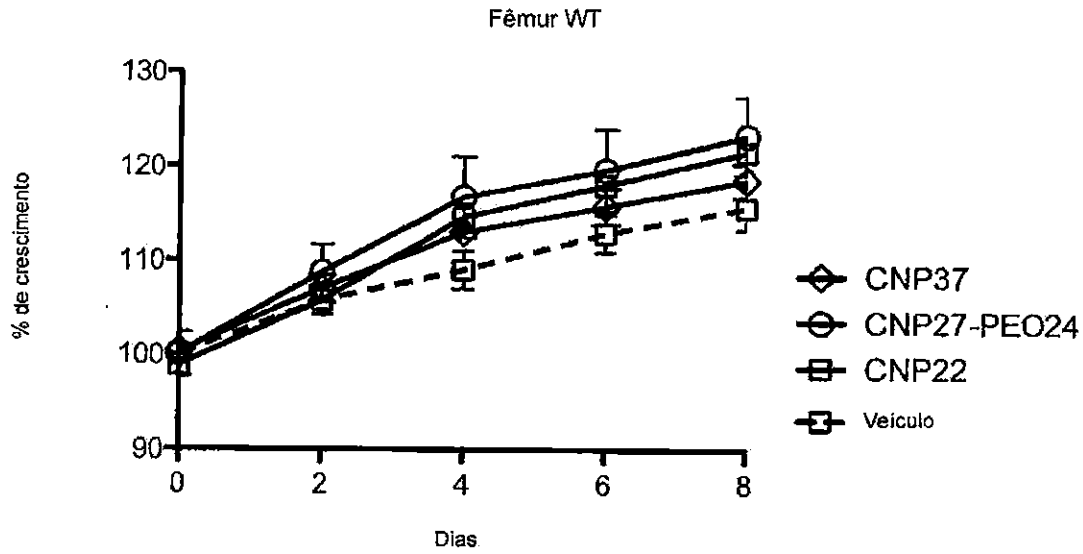

Fêmur WT
% de crescimento
130
120
110
100
90
0
2
4
6
8
Dias
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
Veículo

FIG. 33

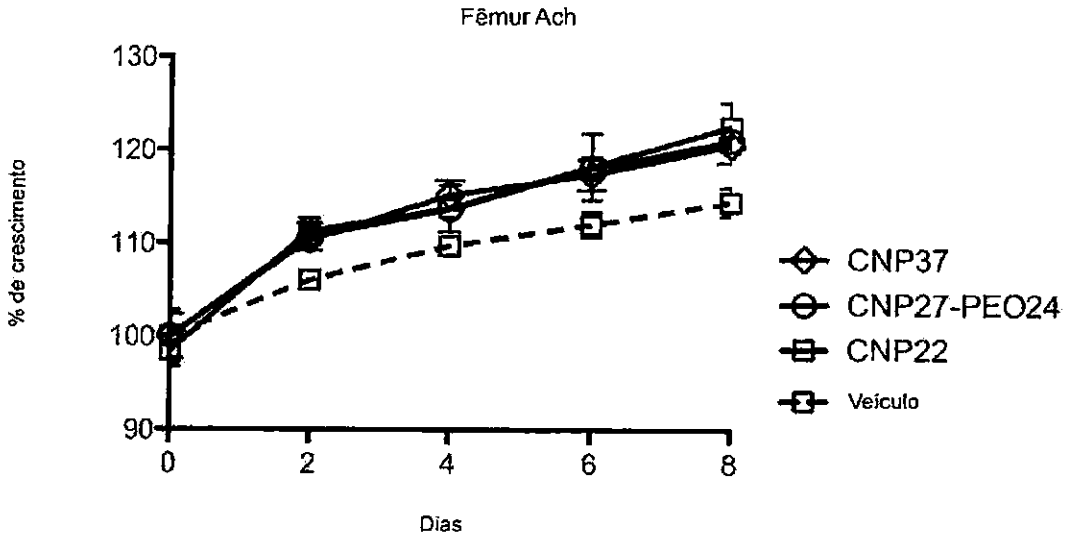
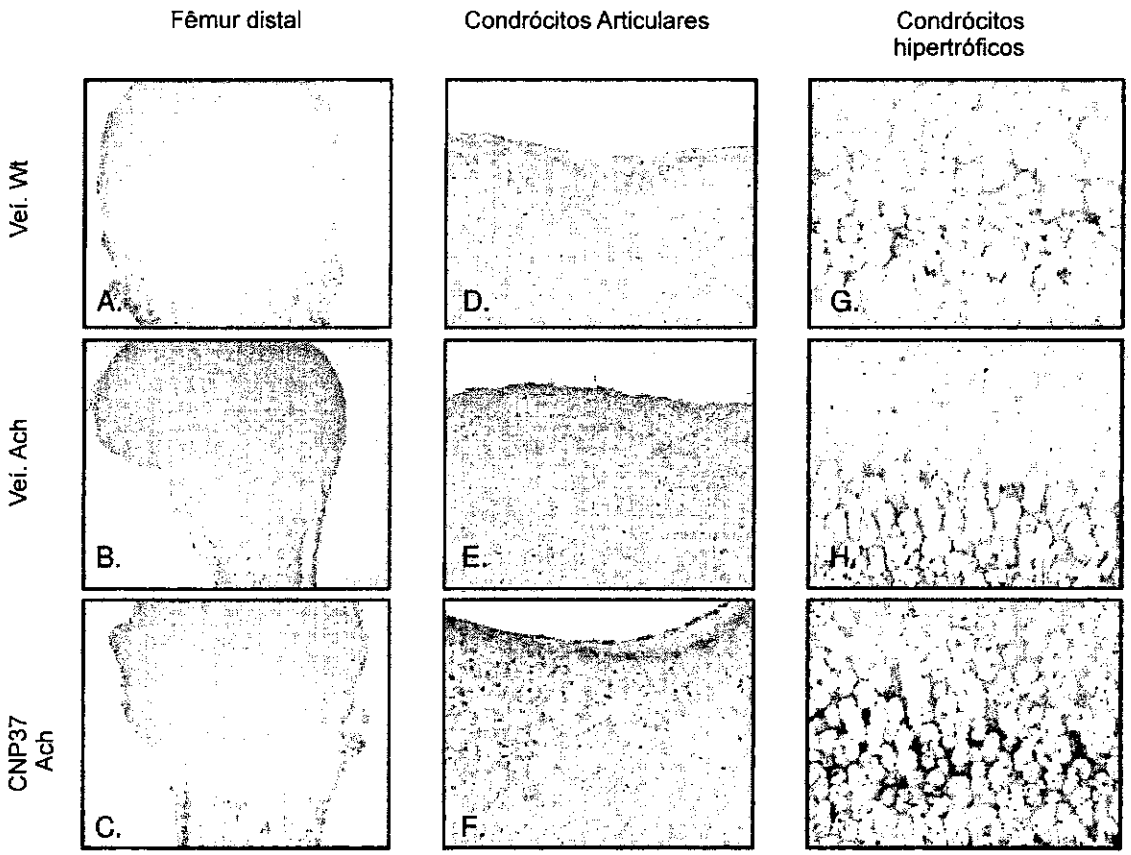
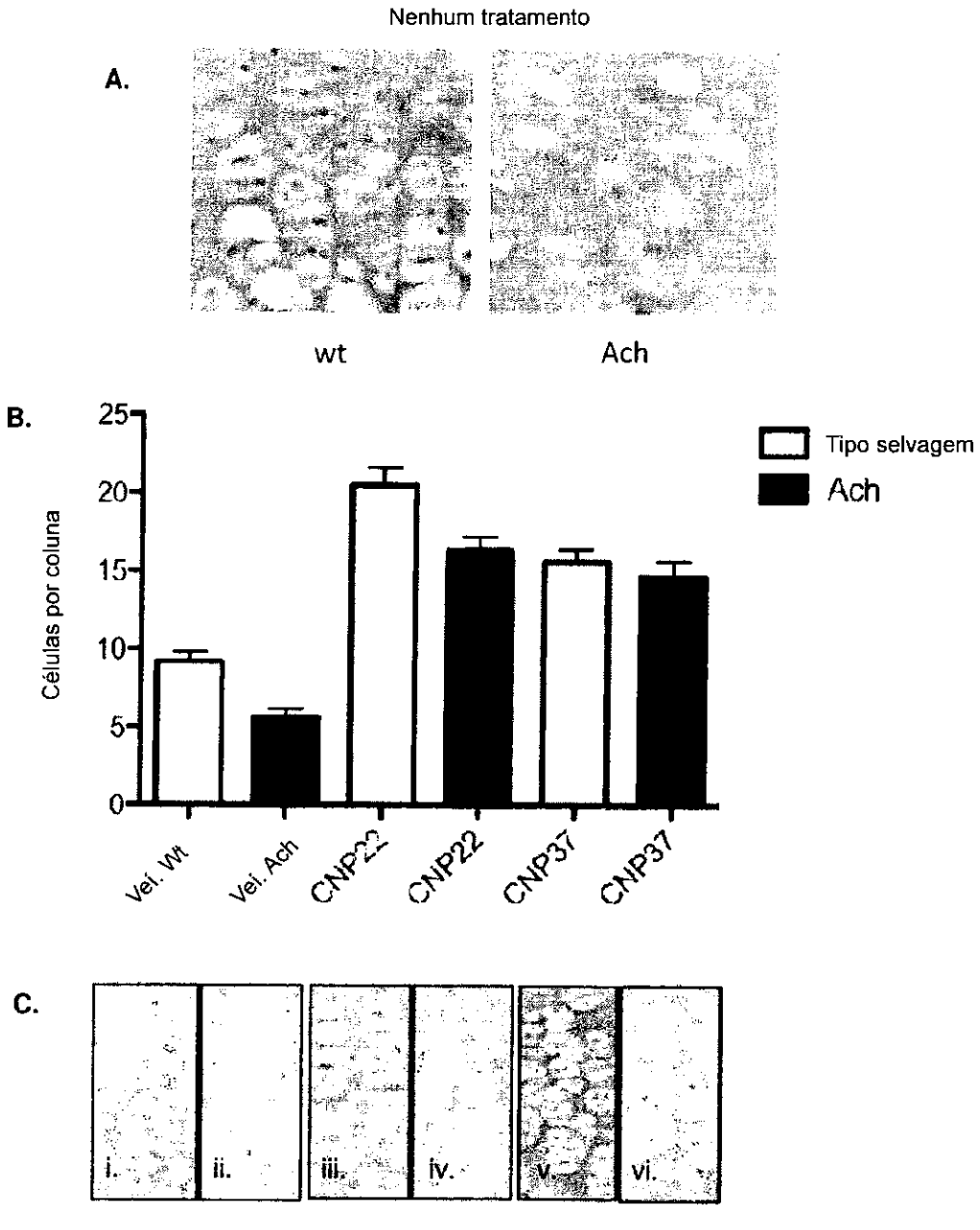

Fêmur Ach
% de crescimento
130
120
110
100
90
0
2
4
6
8
Dias
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
Veículo

FIG. 34


Fêmur distal
Condrócitos Articulares
Condrócitos hipertróficos
Vei. Wt
Vei. Ach
CNP37 Ach
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.

# FIG. 35

Celularidade de Colunas de Proliferação

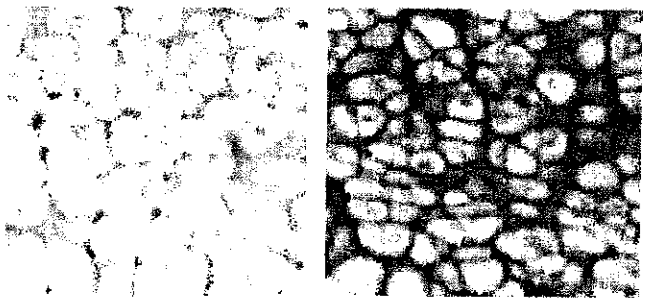


# FIG. 36

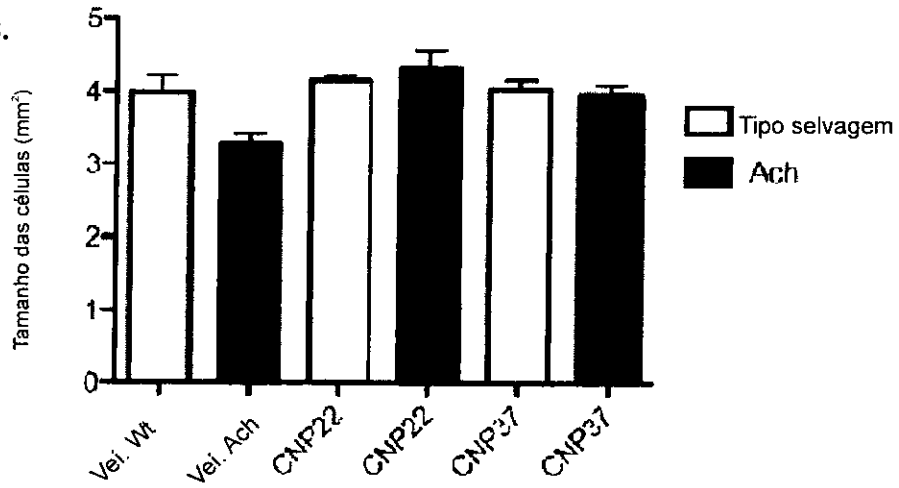
Hipertrofia de Condrócito

Nenhum tratamento

A.




B.




C.

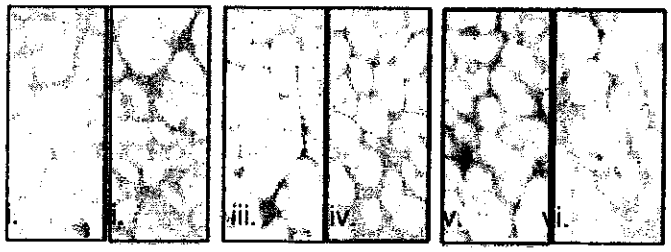


FIG. 37

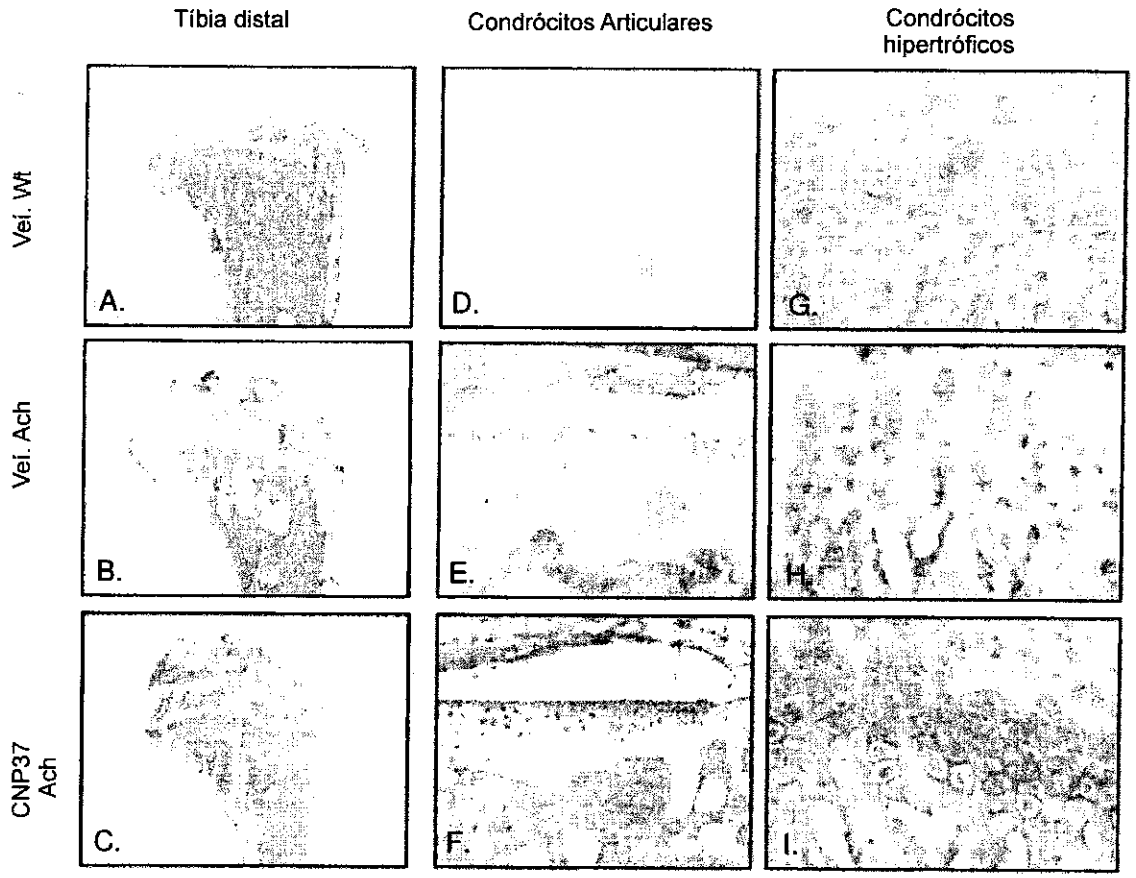
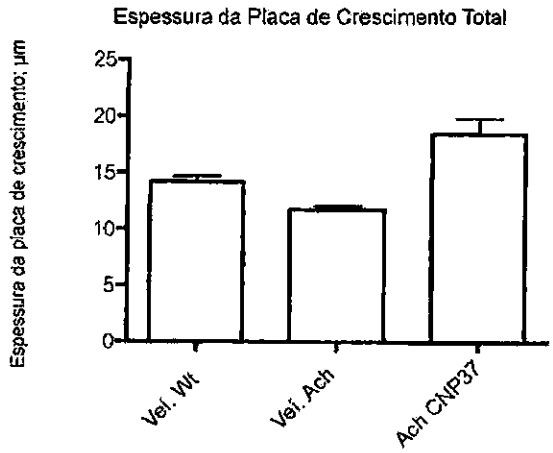
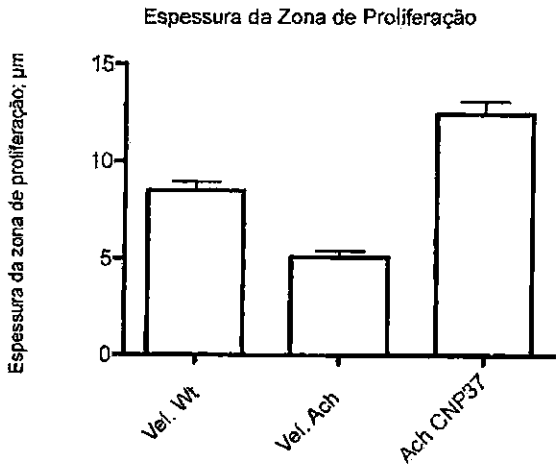

Tíbia distal
Condrócitos Articulares
Condrócitos hipertróficos
Vel. Wt
Vel. Ach
CNP37 Ach
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.

FIG. 38

A.


Espessura da Placa de Crescimento Total
Espessura da placa de crescimento; µm
25
20
15
10
5
0
Veí. Wt
Veí. Ach
Ach CNP37

B.


Espessura da Zona de Proliferação
Espessura da zona de proliferação; µm
15
10
5
0
Veí. Wt
Veí. Ach
Ach CNP37

C.

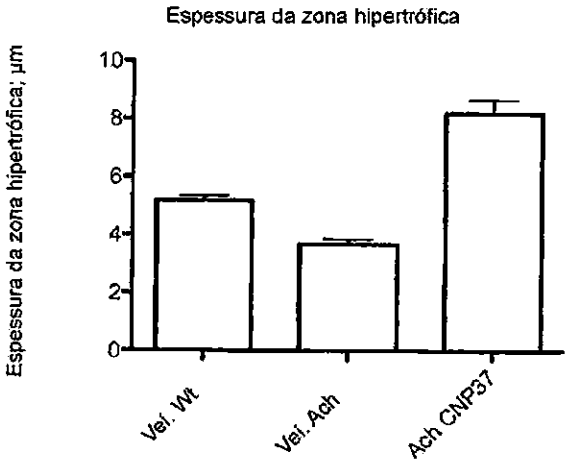

Espessura da zona hipertrófica
Espessura da zona hipertrófica; µm
10
8
6
4
2
0
Veí. Wt
Veí. Ach
Ach CNP37

FIG. 39

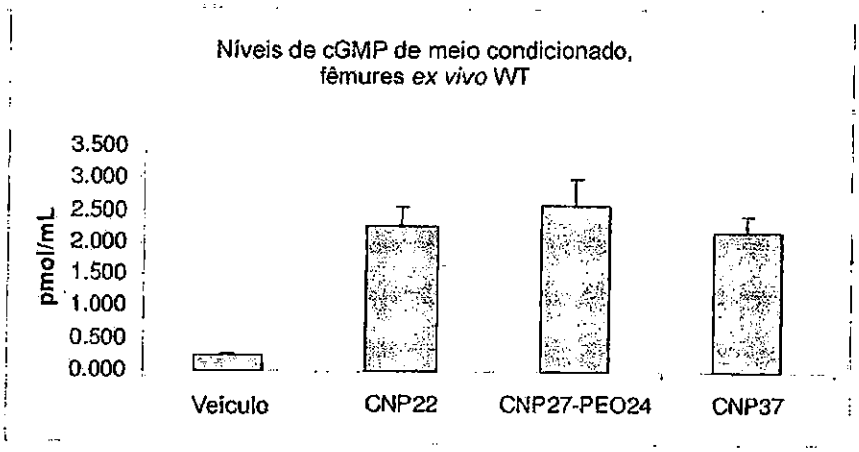

Níveis de cGMP de meio condicionado,
fêmures *ex vivo* WT
pmol/mL
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
Veículo
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 40

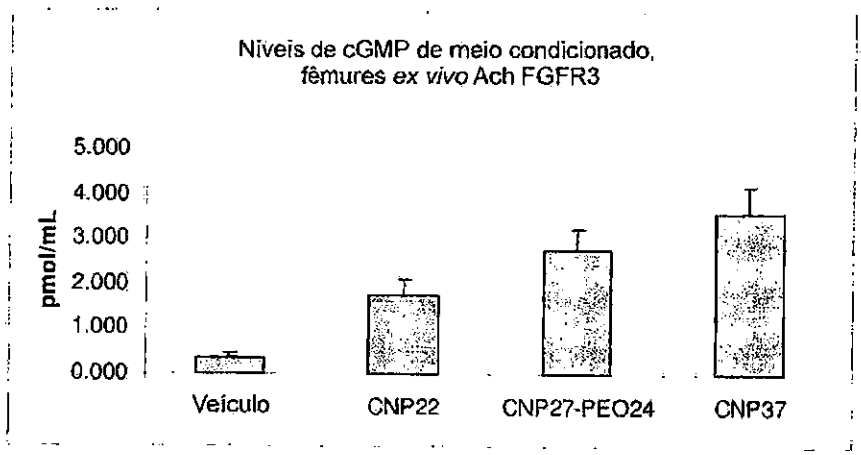

Níveis de cGMP de meio condicionado,
fêmures *ex vivo* Ach FGFR3
pmol/mL
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
Veículo
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 41

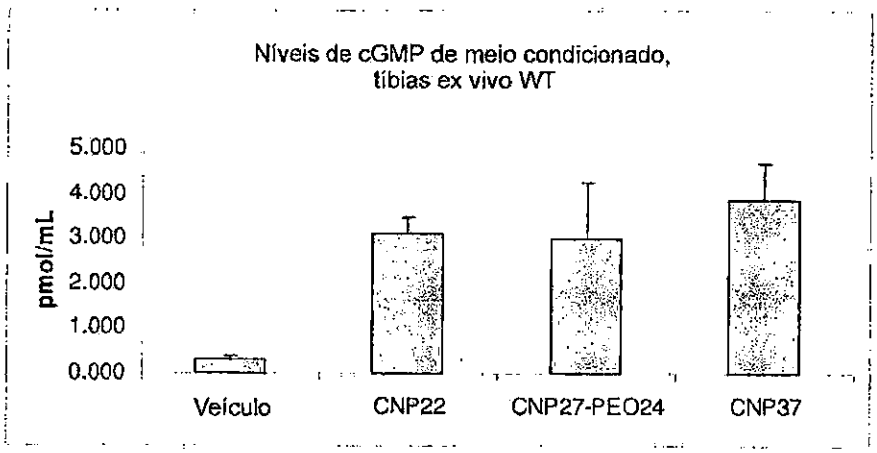

Níveis de cGMP de meio condicionado,
tíbias ex vivo WT
pmol/mL
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
Veículo
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 42

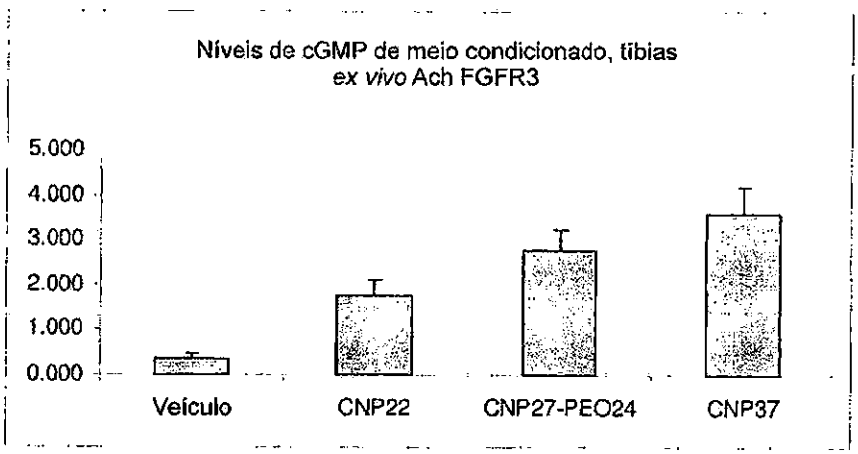

Níveis de cGMP de meio condicionado, tíbias
*ex vivo* Ach FGFR3
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
Veículo
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 43

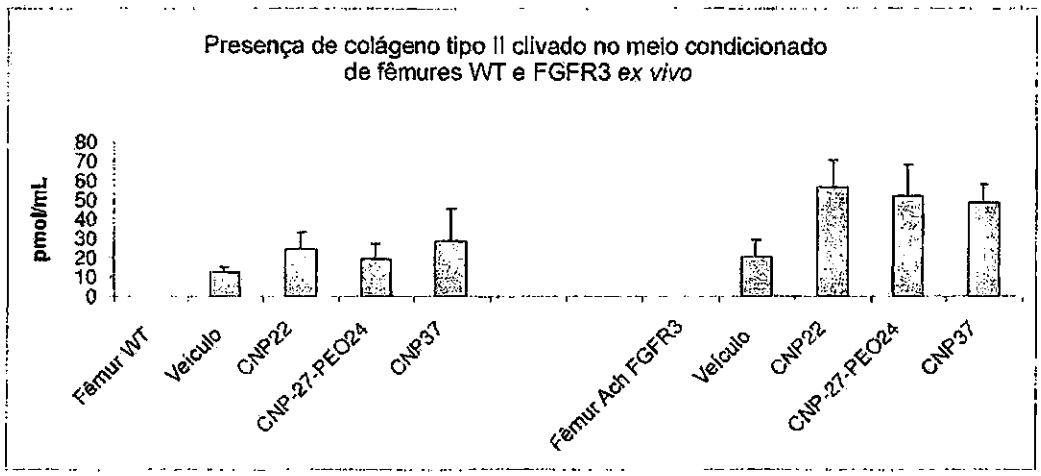

Presença de colágeno tipo II clivado no meio condicionado
de fêmures WT e FGFR3 *ex vivo*
pmol/mL
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Fêmur WT
Veículo
CNP22
CNP-27-PEO24
CNP37
Fêmur Ach FGFR3
Veículo
CNP22
CNP-27-PEO24
CNP37

FIG. 44

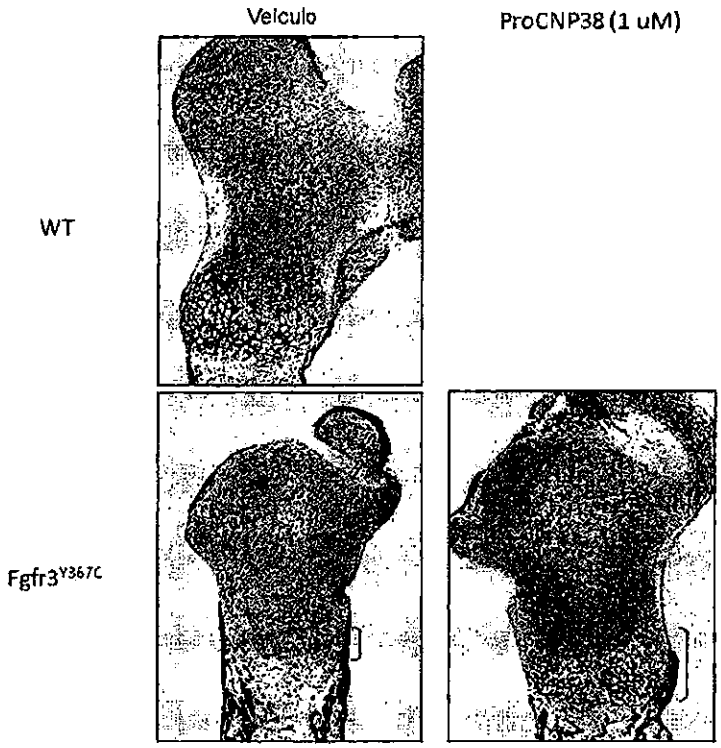

Veículo
ProCNP38 (1 uM)
WT
Fgfr3$^{Y367C}$

FIG. 45

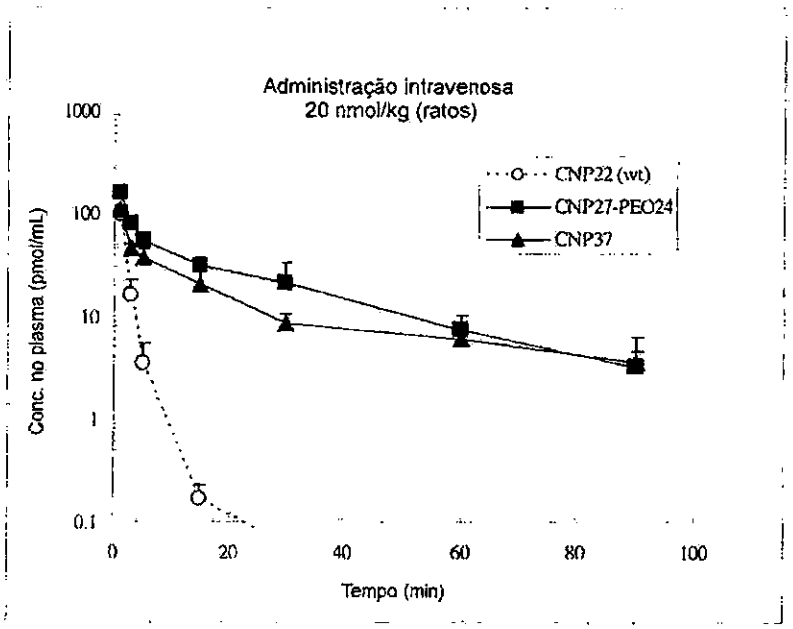

Administração intravenosa
20 nmol/kg (ratos)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
Conc. no plasma (pmol/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
20
40
60
80
100
Tempo (min)

FIG. 46

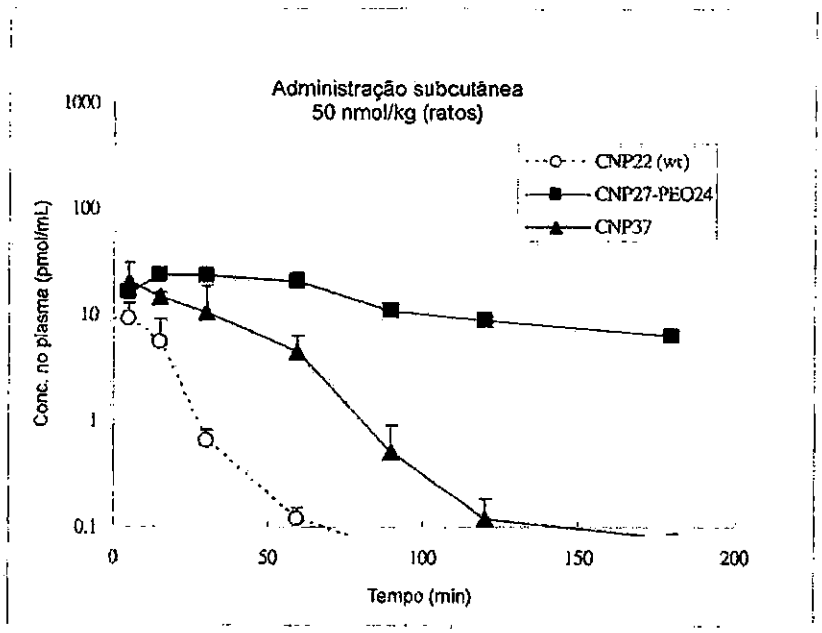

Administração subcutânea
50 nmol/kg (ratos)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
Conc. no plasma (pmol/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
50
100
150
200
Tempo (min)

FIG. 47

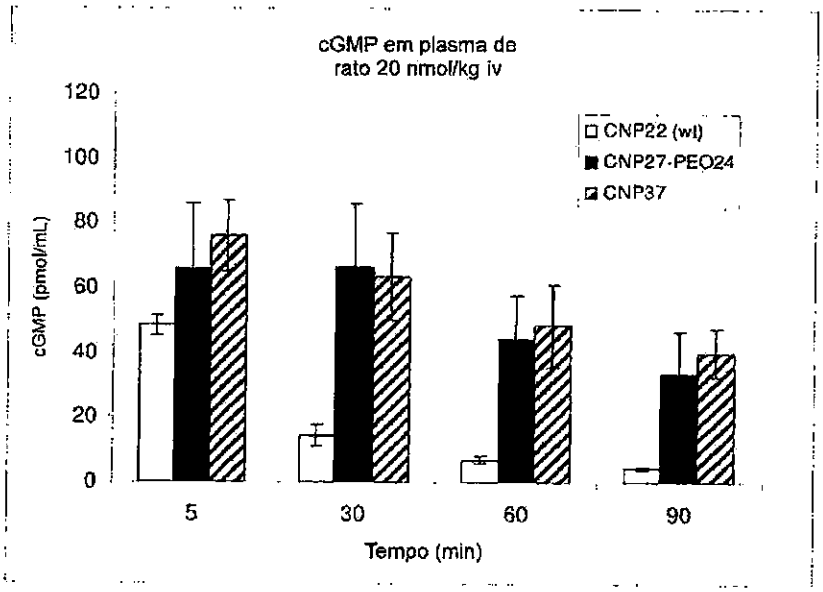

cGMP em plasma de
rato 20 nmol/kg iv
120
100
80
60
40
20
0
cGMP (pmol/mL)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
5
30
60
90
Tempo (min)

FIG. 48

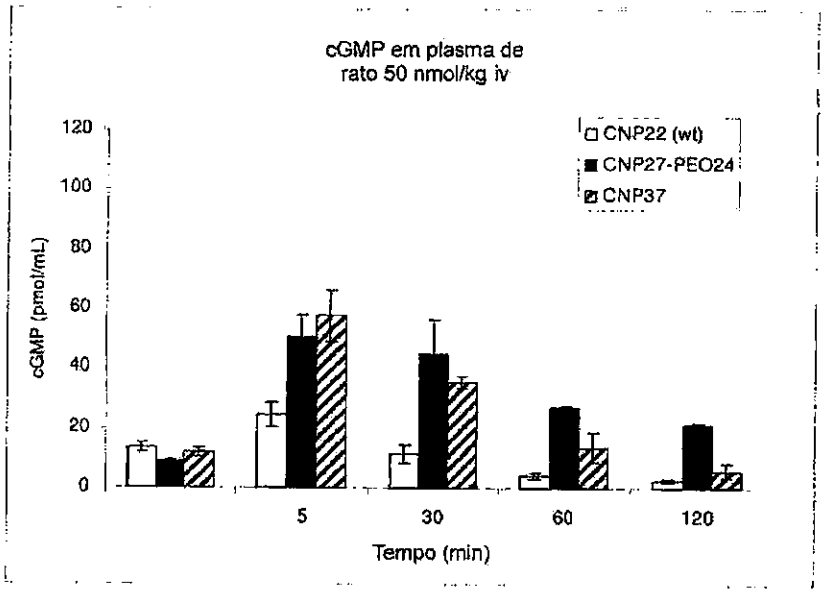

cGMP em plasma de
rato 50 nmol/kg iv
120
100
80
60
40
20
0
cGMP (pmol/mL)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
5
30
60
120
Tempo (min)

FIG. 49

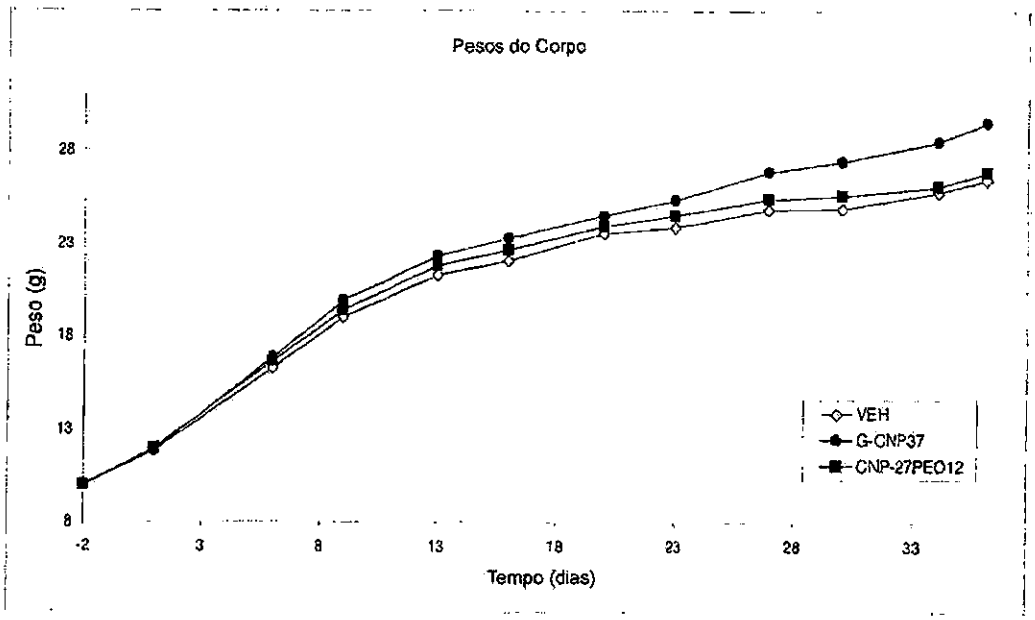

Pesos do Corpo
Peso (g)
28
23
18
13
8
-2
3
8
13
18
23
28
33
Tempo (dias)
VEH
G-CNP37
CNP-27PEO12

FIG. 50

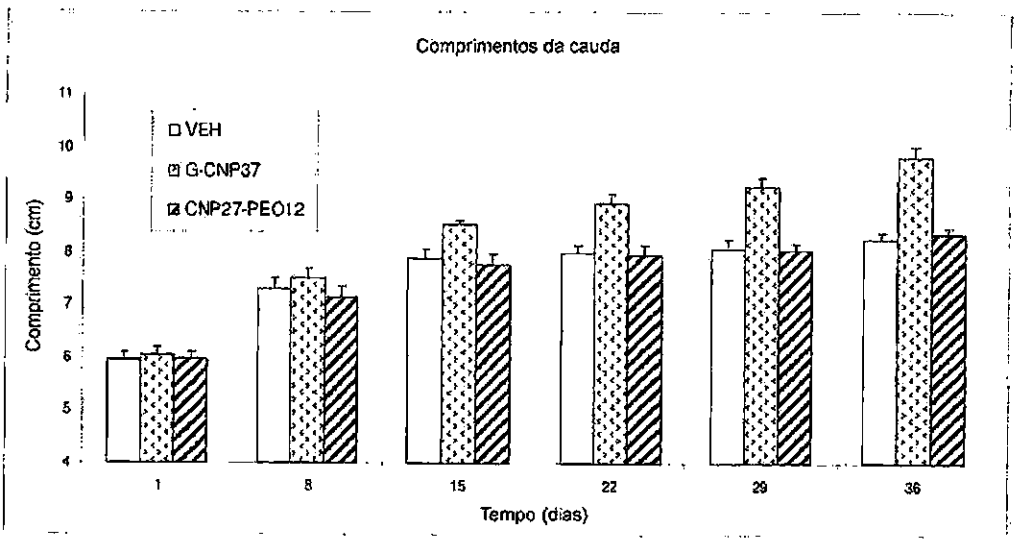

Comprimentos da cauda
Comprimento (cm)
11
10
9
8
7
6
5
4
VEH
G-CNP37
CNP27-PEO12
1
8
15
22
29
36
Tempo (dias)

FIG. 51

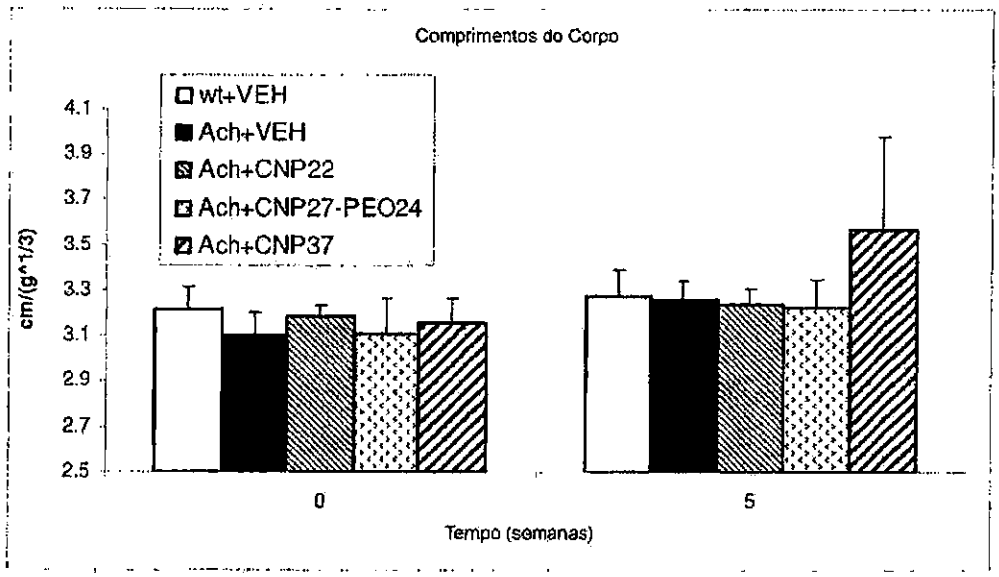

Comprimentos do Corpo
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
Ach+CNP27-PEO24
Ach+CNP37
cm/(g^1/3)
4.1
3.9
3.7
3.5
3.3
3.1
2.9
2.7
2.5
0
5
Tempo (semanas)

FIG. 52

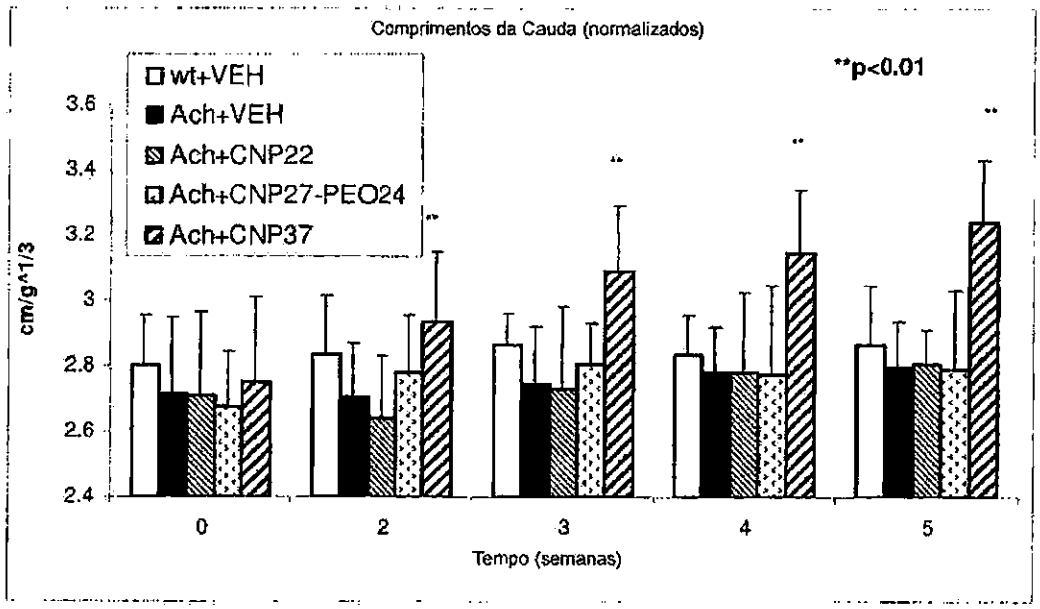
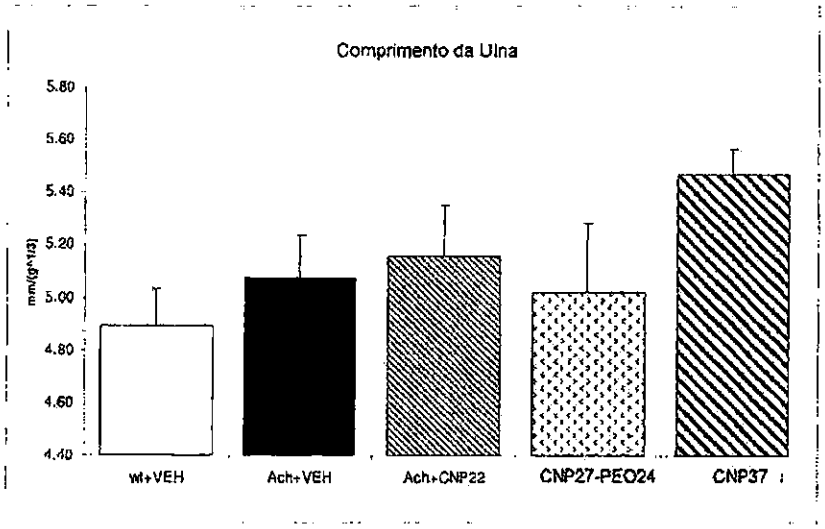

Comprimentos da Cauda (normalizados)
**p<0.01
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
Ach+CNP27-PEO24
Ach+CNP37
cm/g^1/3
3.6
3.4
3.2
3
2.8
2.6
2.4
0
2
3
4
5
Tempo (semanas)

FIG. 53

A.


Comprimento da Ulna
5.80
5.60
5.40
5.20
5.00
4.80
4.60
4.40
mm/(g^1/3)
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

B.

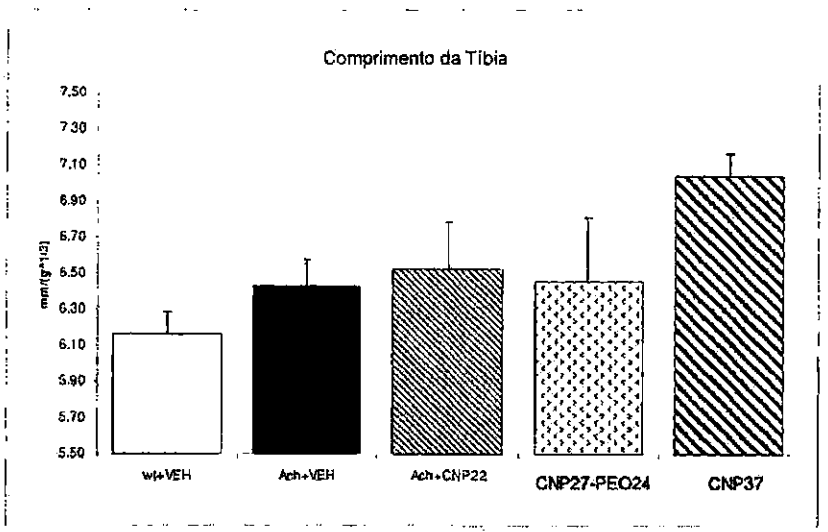
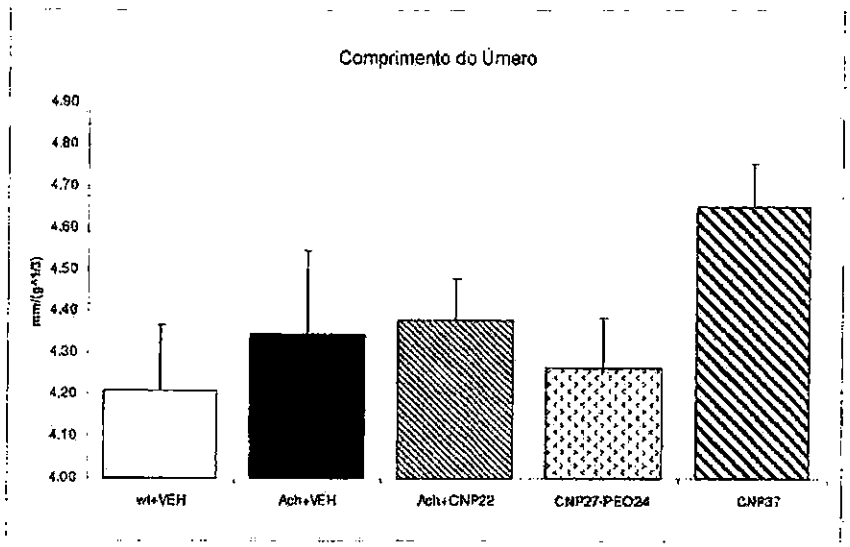

Comprimento da Tíbia
7.50
7.30
7.10
6.90
6.70
6.50
6.30
6.10
5.90
5.70
5.50
mm/(g^1/3)
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 54

A.


Comprimento do Úmero
mm/(g^1/3)
4.90
4.80
4.70
4.60
4.50
4.40
4.30
4.20
4.10
4.00
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

B.

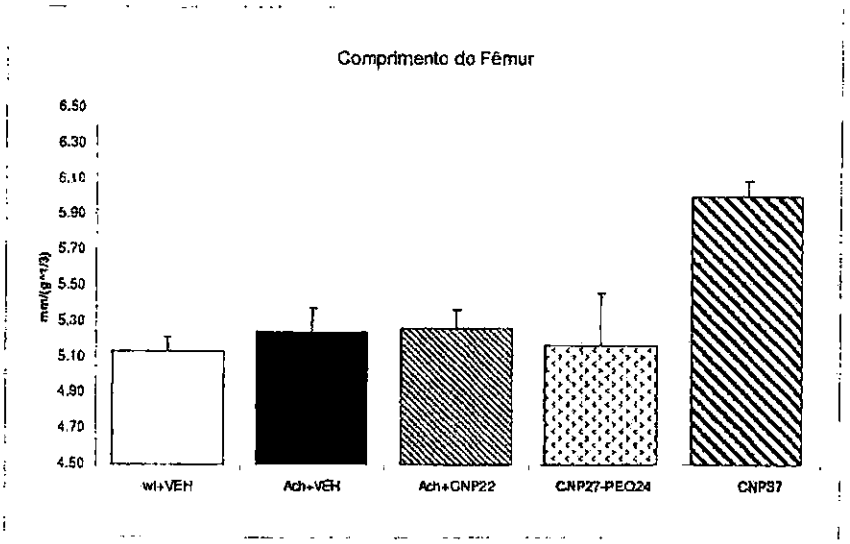

Comprimento do Fêmur
mm/(g^1/3)
6.50
6.30
6.10
5.90
5.70
5.50
5.30
5.10
4.90
4.70
4.50
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 55

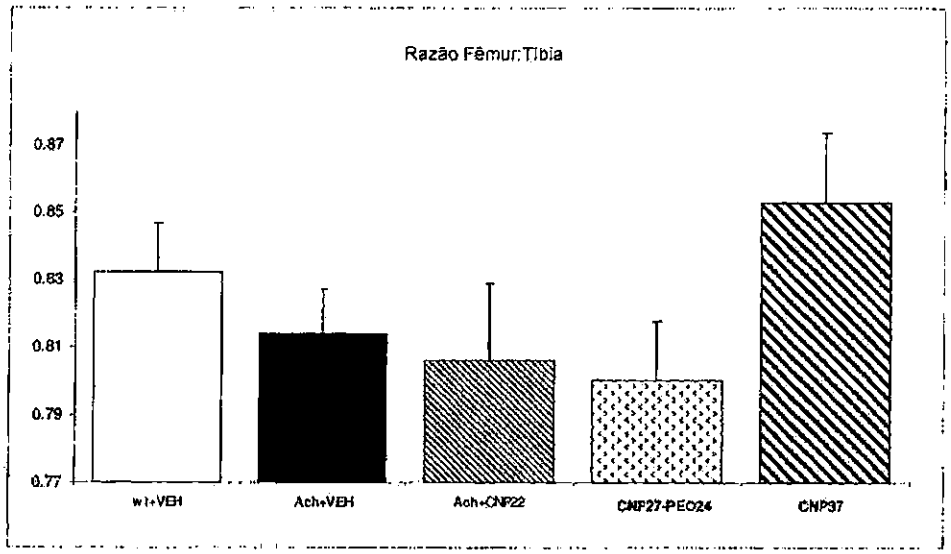

Razão Fêmur:Tíbia
0.87
0.85
0.83
0.81
0.79
0.77
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 56

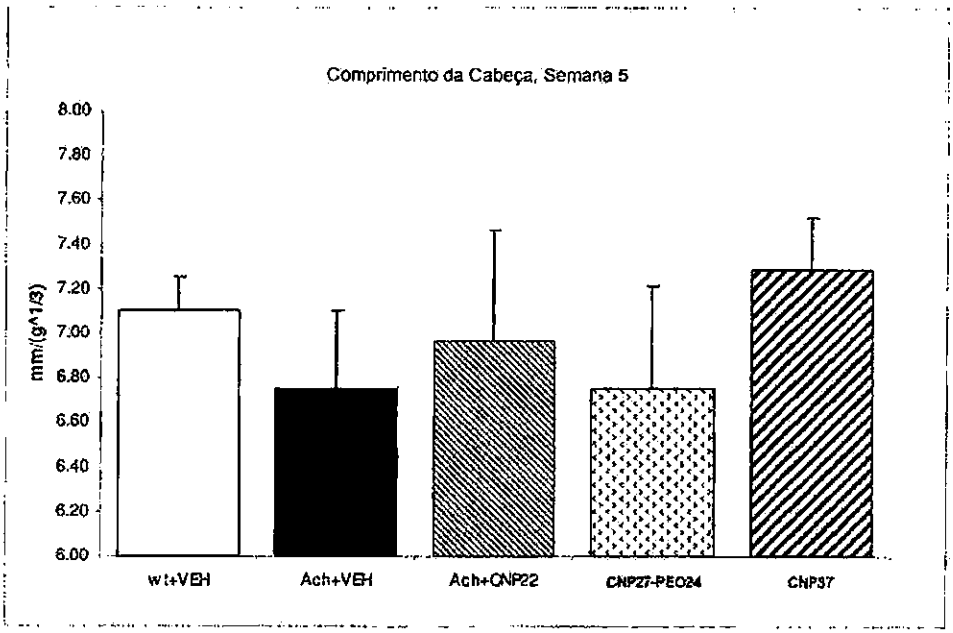

Comprimento da Cabeça, Semana 5
mm/(g^1/3)
8.00
7.80
7.60
7.40
7.20
7.00
6.80
6.60
6.40
6.20
6.00
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 57

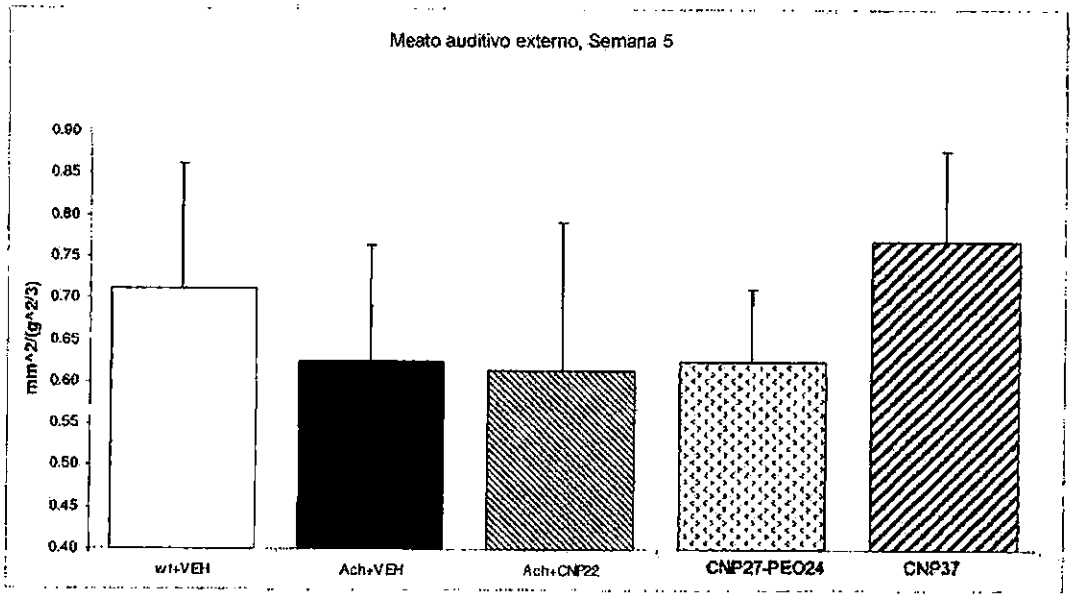

Meato auditivo externo, Semana 5
mm^2/(g^2/3)
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 58

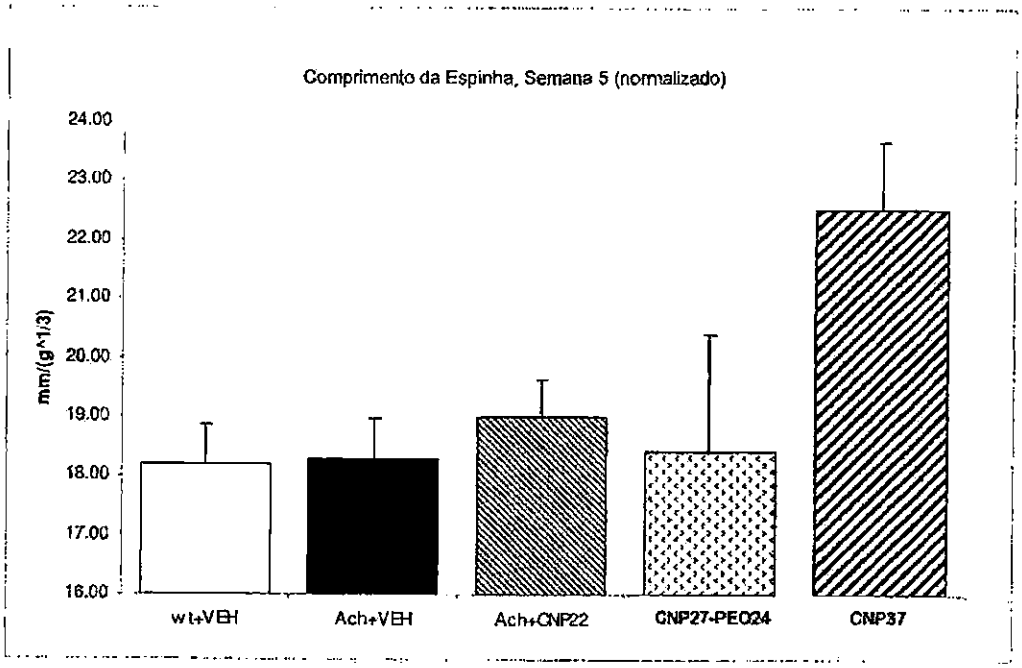

Comprimento da Espinha, Semana 5 (normalizado)
mm/(g^1/3)
24.00
23.00
22.00
21.00
20.00
19.00
18.00
17.00
16.00
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

FIG. 59

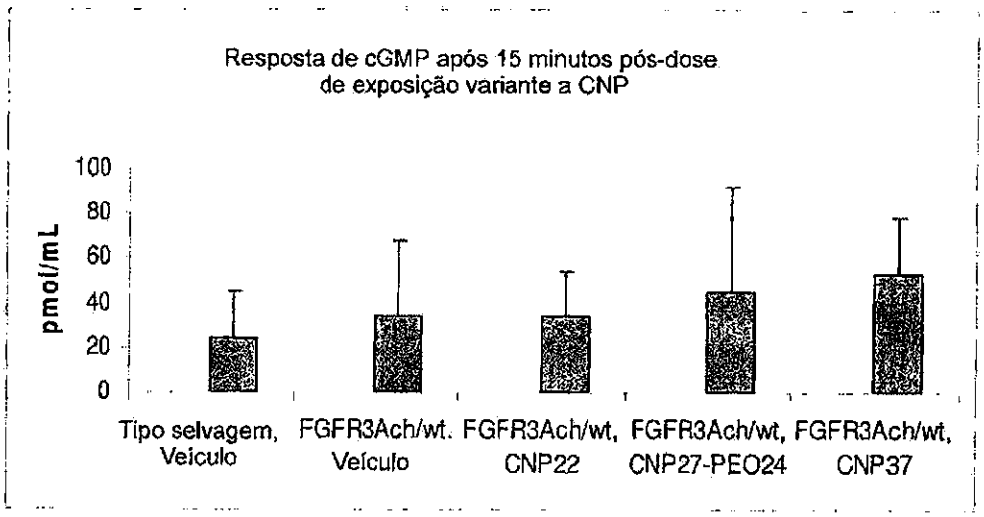

Resposta de cGMP após 15 minutos pós-dose de exposição variante a CNP
pmol/mL
100
80
60
40
20
0
Tipo selvagem, Veículo
FGFR3Ach/wt. Veículo
FGFR3Ach/wt, CNP22
FGFR3Ach/wt, CNP27-PEO24
FGFR3Ach/wt, CNP37

FIG. 60

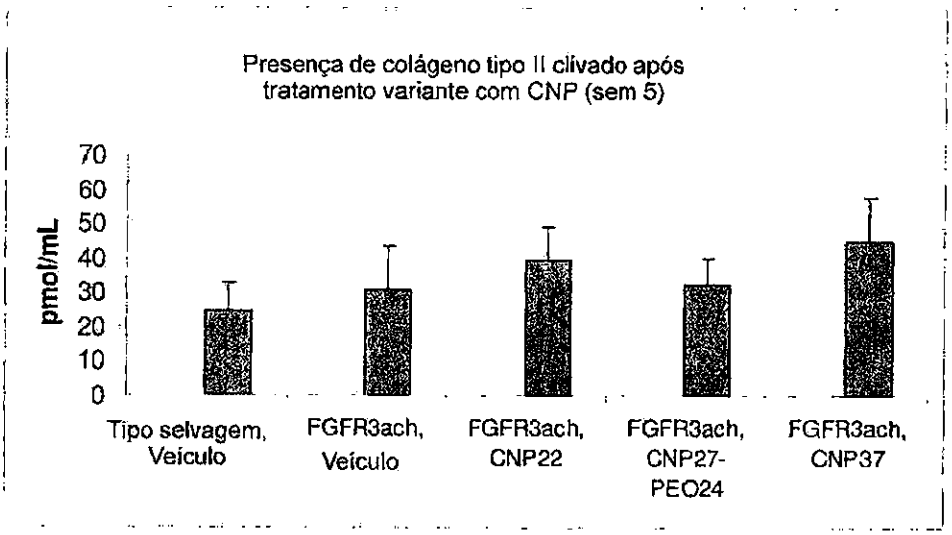

Presença de colágeno tipo II clivado após tratamento variante com CNP (sem 5)
pmol/mL
70
60
50
40
30
20
10
0
Tipo selvagem, Veículo
FGFR3ach, Veículo
FGFR3ach, CNP22
FGFR3ach, CNP27-PEO24
FGFR3ach, CNP37

FIG. 61

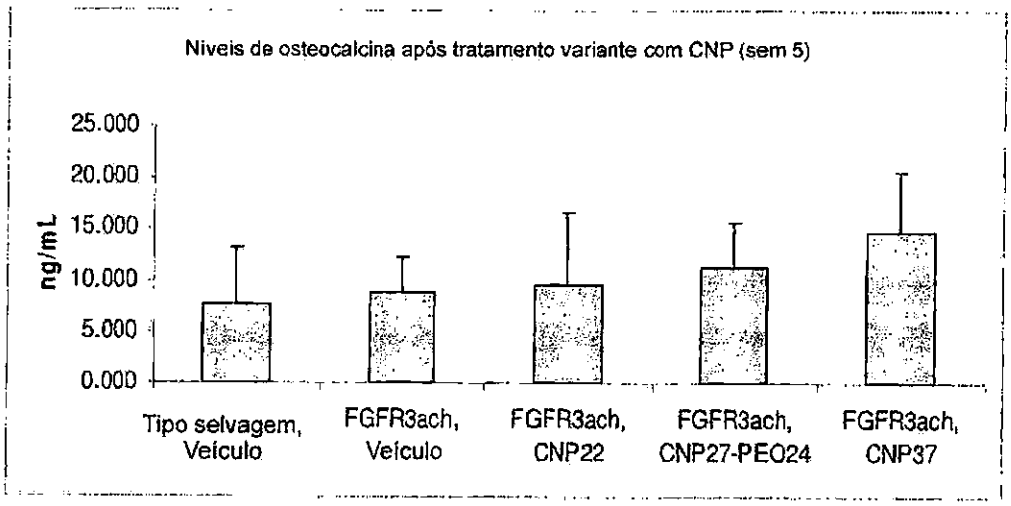

Niveis de osteocalcina após tratamento variante com CNP (sem 5)
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0.000
ng/mL
Tipo selvagem, Veículo
FGFR3ach, Veículo
FGFR3ach, CNP22
FGFR3ach, CNP27-PEO24
FGFR3ach, CNP37

FIG. 62

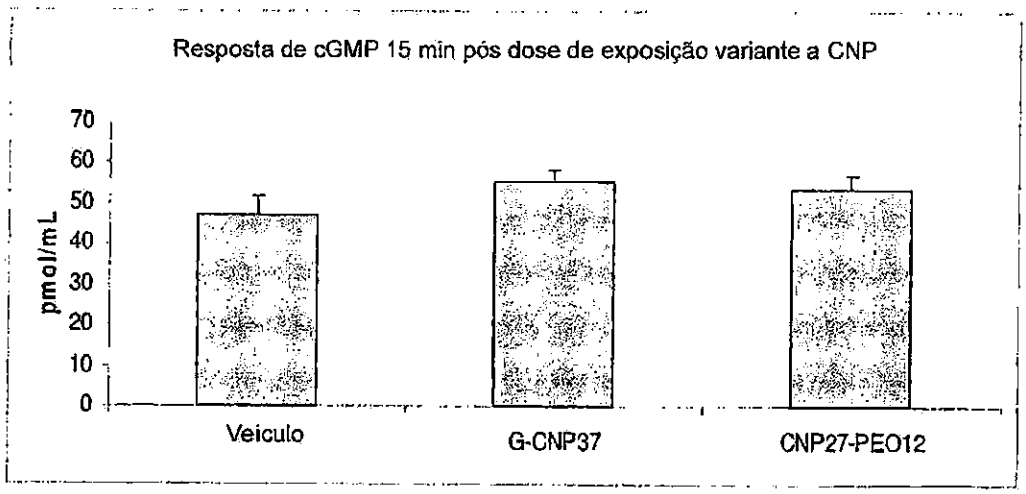

Resposta de cGMP 15 min pós dose de exposição variante a CNP
70
60
50
40
30
20
10
0
pmol/mL
Veículo
G-CNP37
CNP27-PEO12

FIG. 63

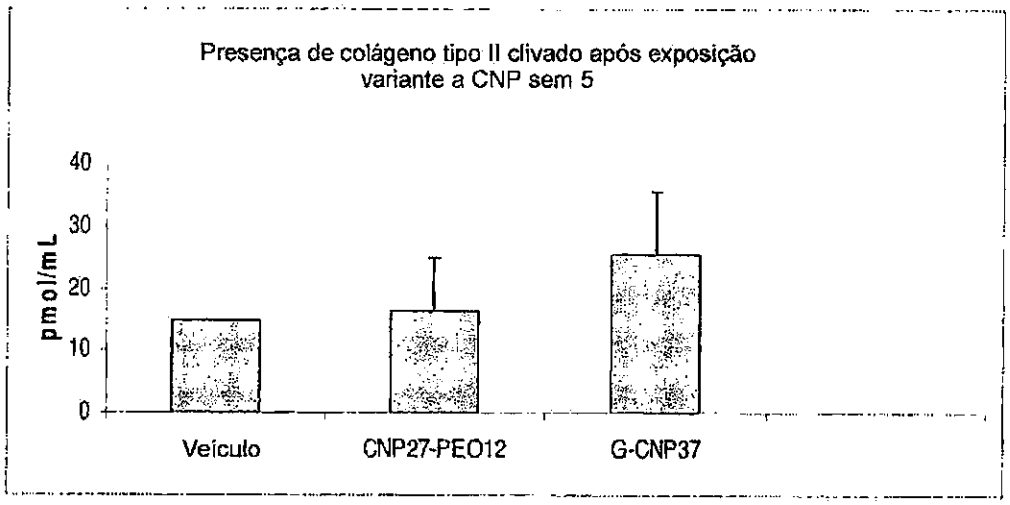
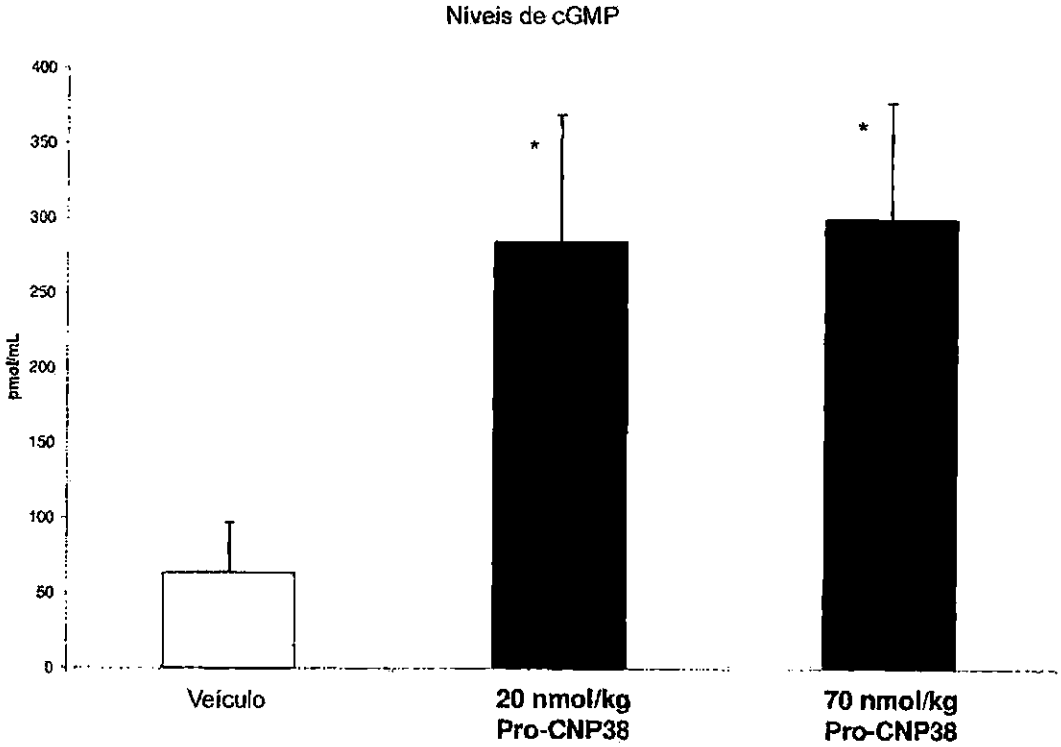



FIG. 64




* $p < 0.05$

FIG. 65

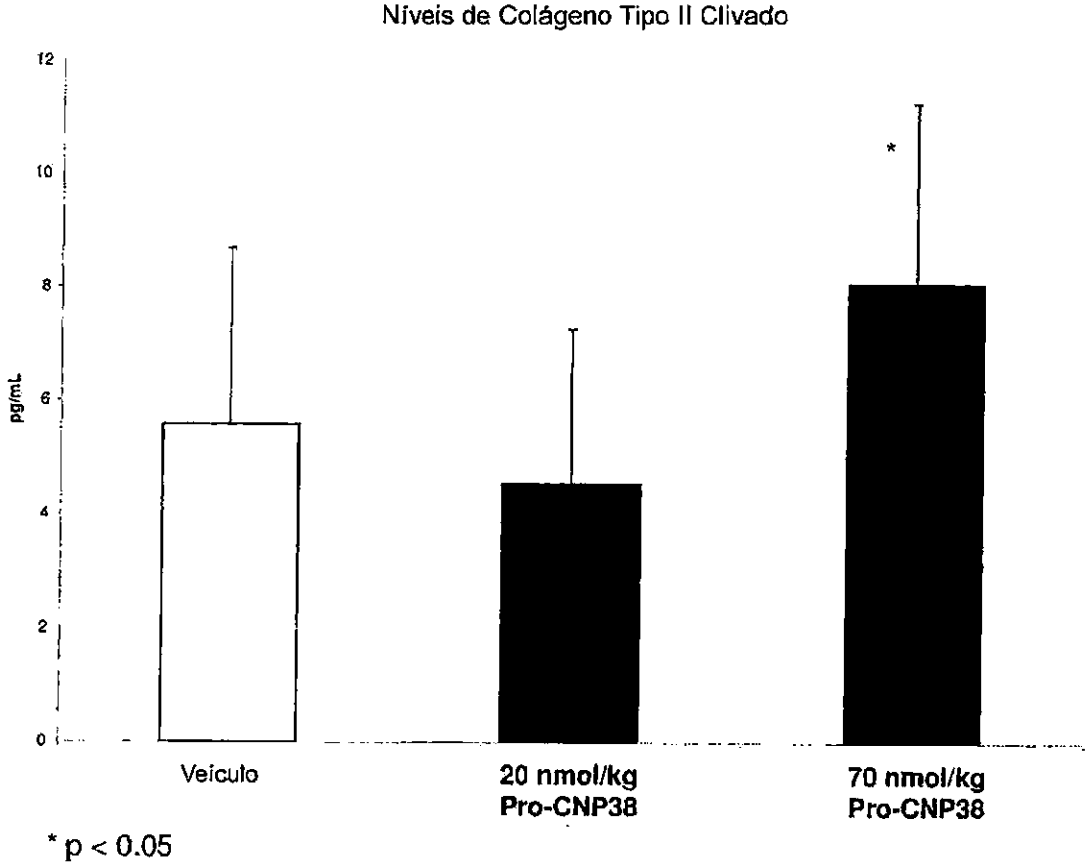

Níveis de Colágeno Tipo II Clivado
pg/mL
12
10
8
6
4
2
0
*
Veículo
20 nmol/kg
Pro-CNP38
70 nmol/kg
Pro-CNP38
* p < 0.05

FIG. 66

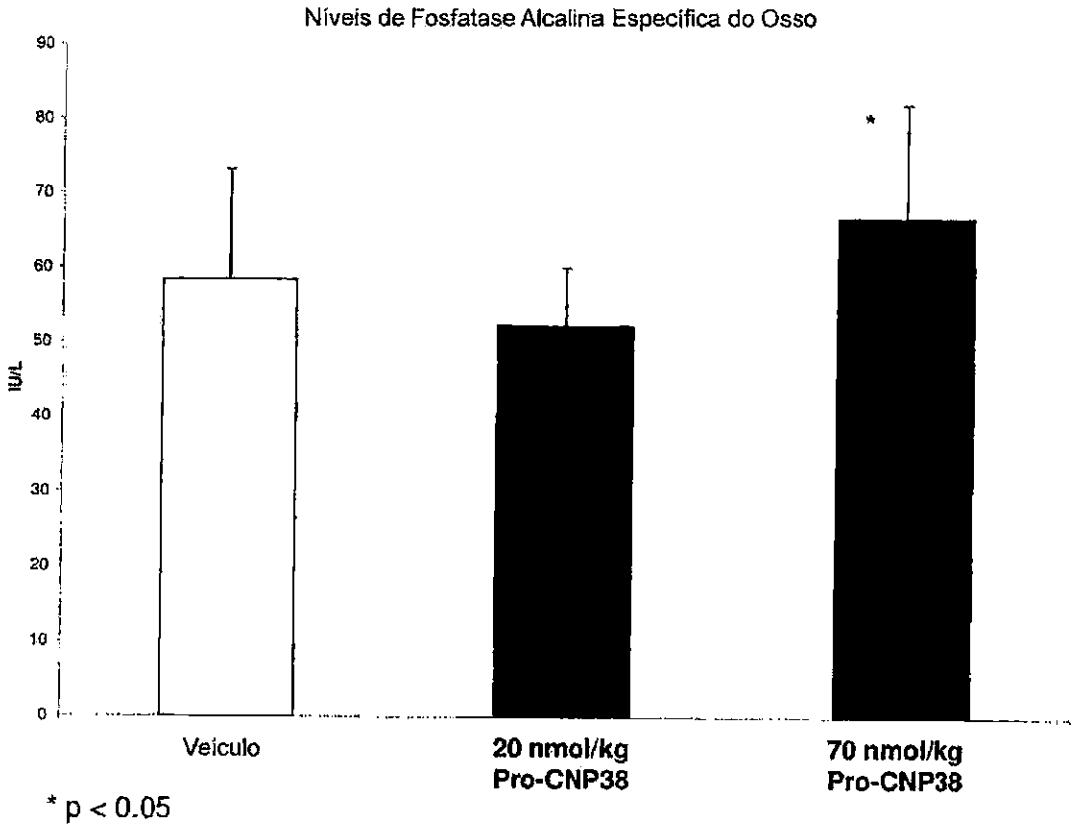

Níveis de Fosfatase Alcalina Específica do Osso
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IU/L
*
Veículo
20 nmol/kg
Pro-CNP38
70 nmol/kg
Pro-CNP38
* p < 0.05

FIG. 67

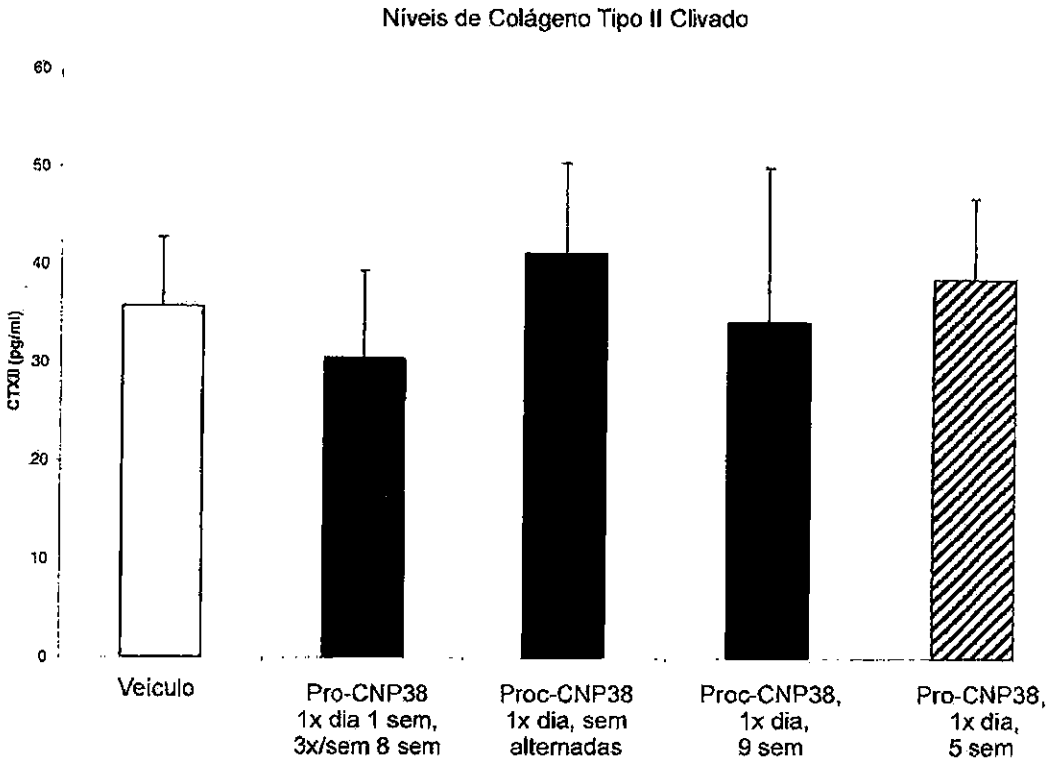
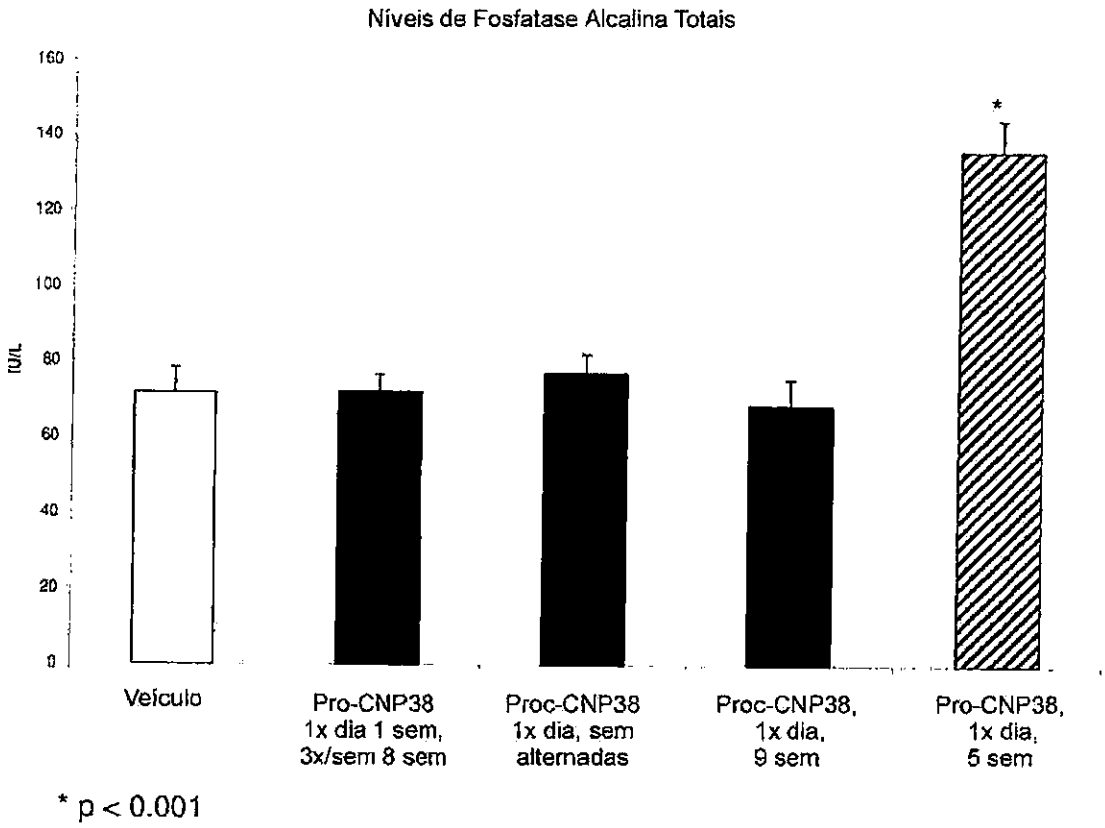

Níveis de Colágeno Tipo II Clivado
CTXII (pg/ml)
60
50
40
30
20
10
0
Veículo
Pro-CNP38 1x dia 1 sem, 3x/sem 8 sem
Proc-CNP38 1x dia, sem alternadas
Proc-CNP38, 1x dia, 9 sem
Pro-CNP38, 1x dia, 5 sem

FIG. 68


Níveis de Fosfatase Alcalina Totais
160
140
120
100
80
60
40
20
0
U/L
*
Veículo
Pro-CNP38 1x dia 1 sem, 3x/sem 8 sem
Proc-CNP38 1x dia, sem alternadas
Proc-CNP38, 1x dia, 9 sem
Pro-CNP38, 1x dia, 5 sem

* $p < 0.001$

FIG. 69

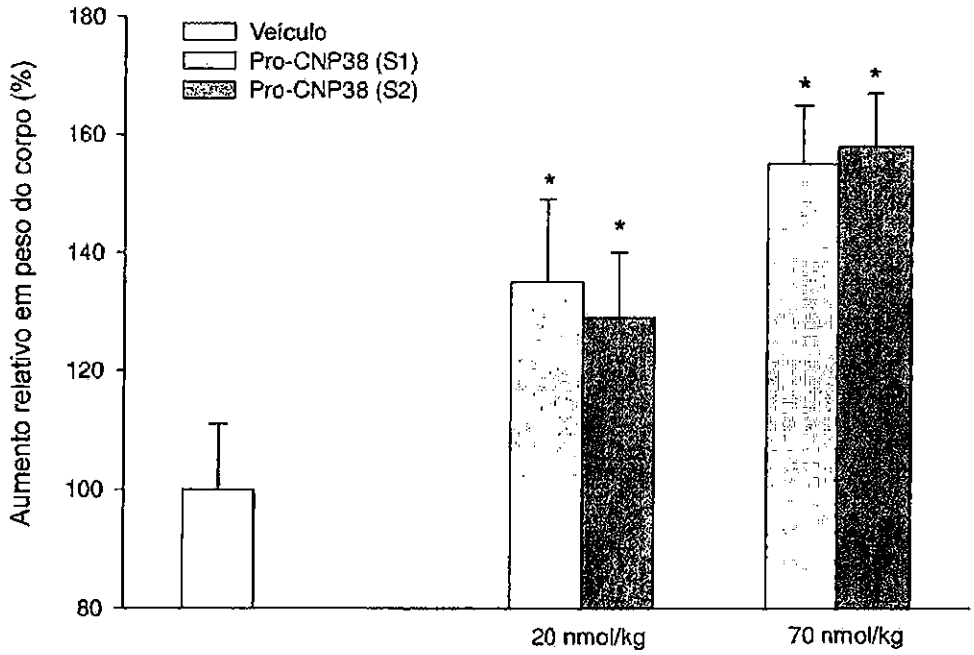
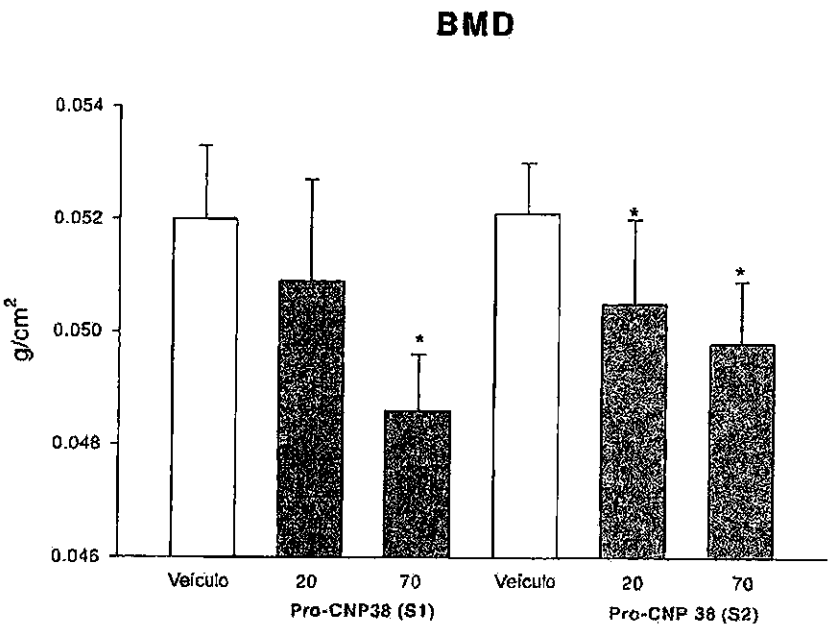

Veículo
Pro-CNP38 (S1)
Pro-CNP38 (S2)
Aumento relativo em peso do corpo (%)
180
160
140
120
100
80
*
*
*
*
20 nmol/kg
70 nmol/kg

FIG. 70

A.


BMD
0.054
0.052
0.050
0.048
0.046
g/cm²
Veículo
20
70
Veículo
20
70
Pro-CNP38 (S1)
Pro-CNP 38 (S2)

B.

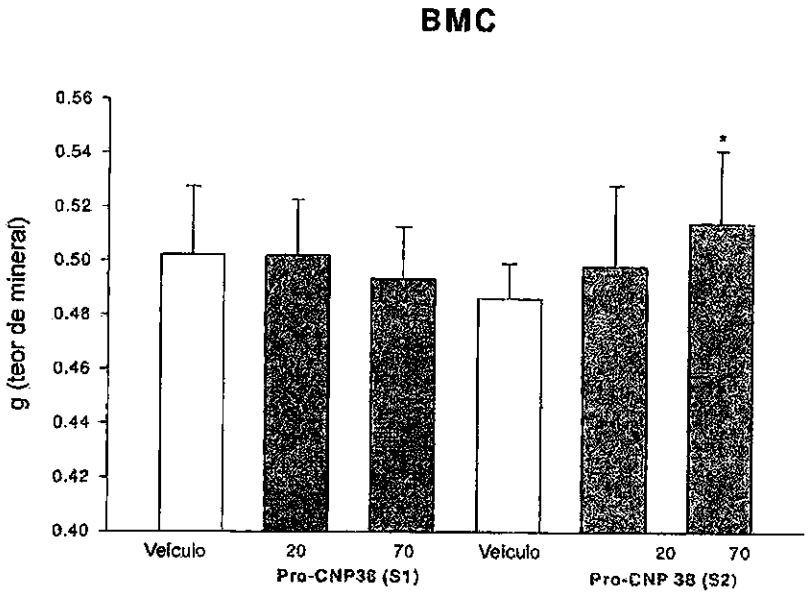

BMC
0.56
0.54
0.52
0.50
0.48
0.46
0.44
0.42
0.40
g (teor de mineral)
Veículo
20
70
Veículo
20
70
Pro-CNP38 (S1)
Pro-CNP 38 (S2)

FIG. 71

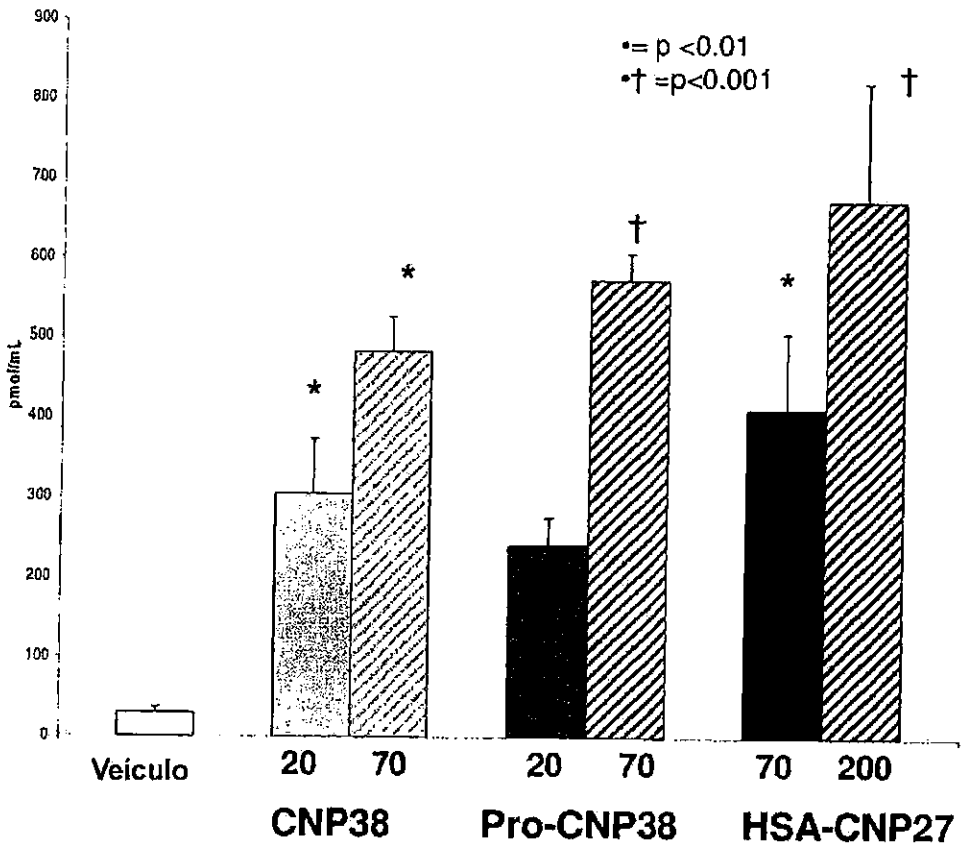

*= p <0.01
*† =p<0.001
pmol/mL
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Veículo
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

FIG. 72

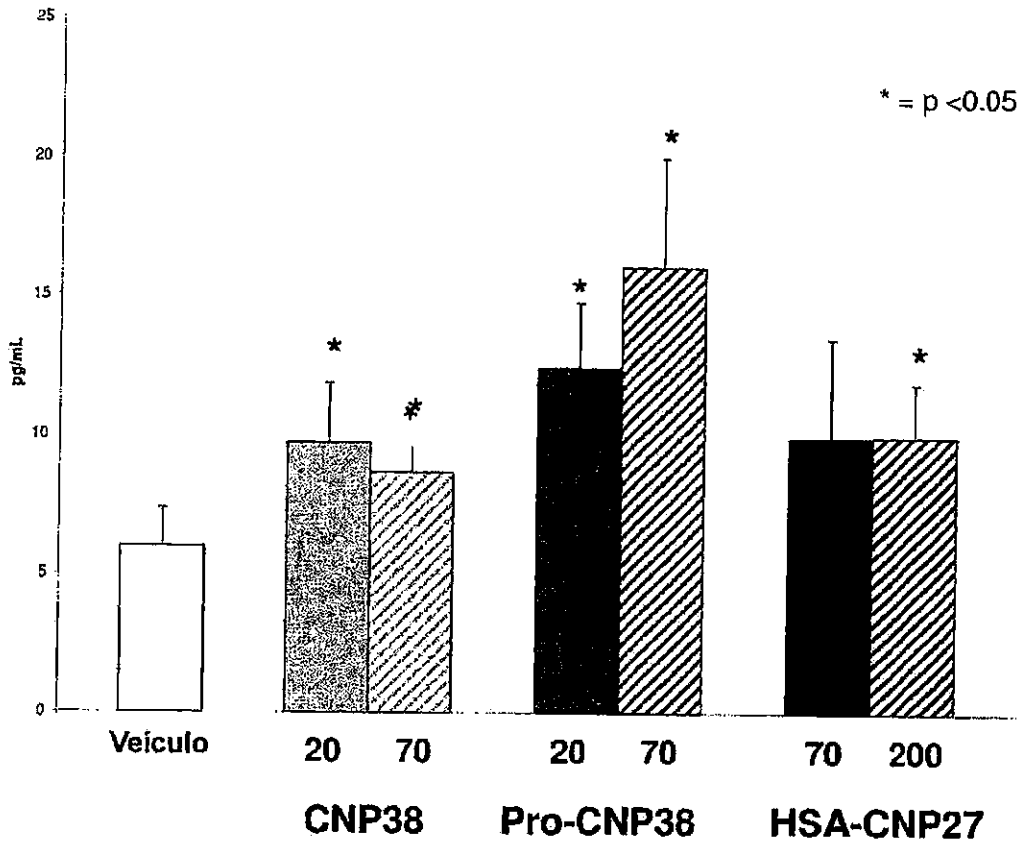

* = p <0.05
pg/mL
25
20
15
10
5
0
Veículo
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

FIG. 73

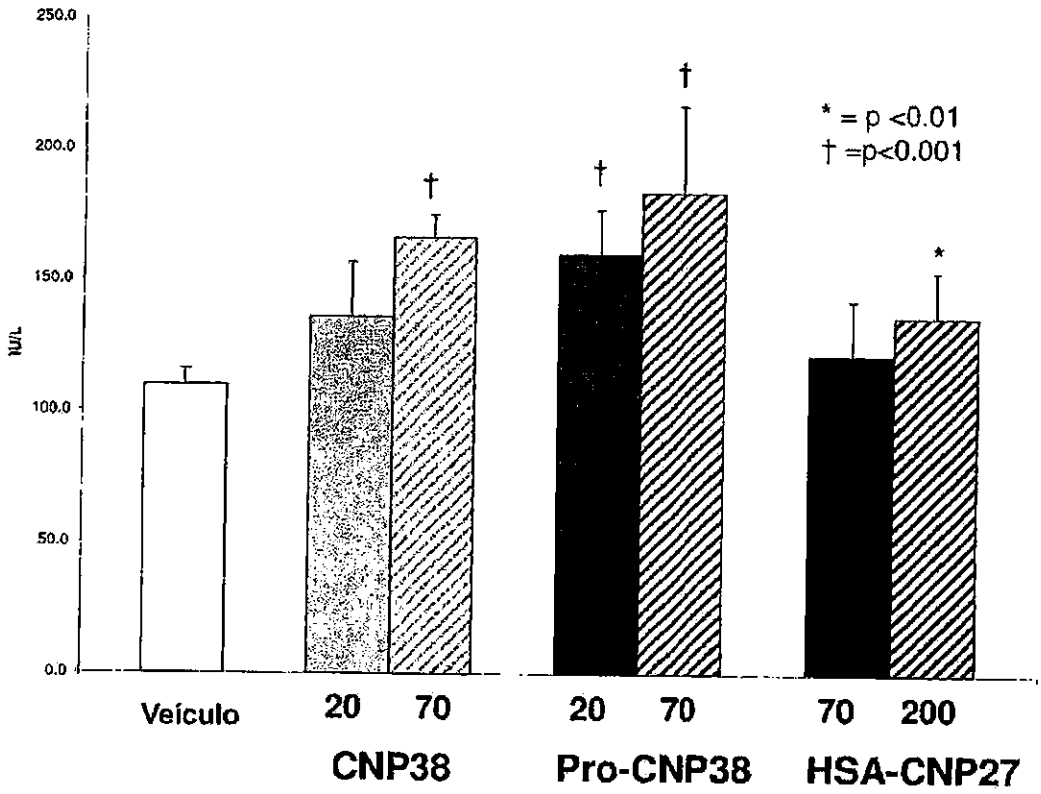
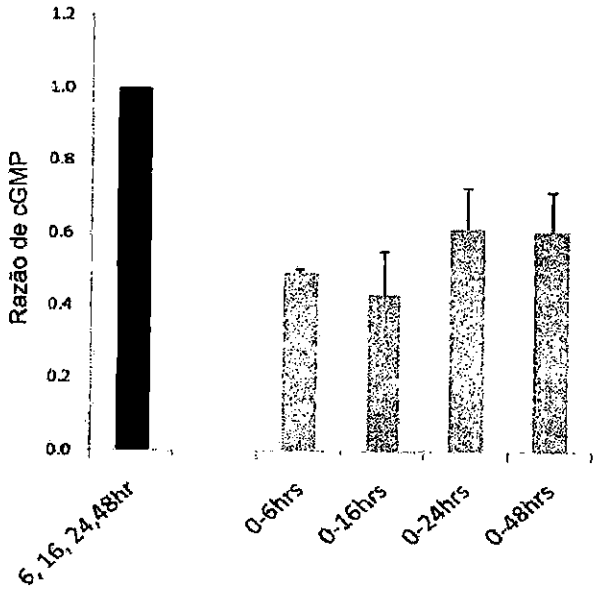

250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
ng/L
* = p <0.01
† =p<0.001
†
†
†
*
Veículo
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

FIG. 74

A.


Razão de cGMP
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6, 16, 24,48hr
0-6hrs
0-16hrs
0-24hrs
0-48hrs

B.

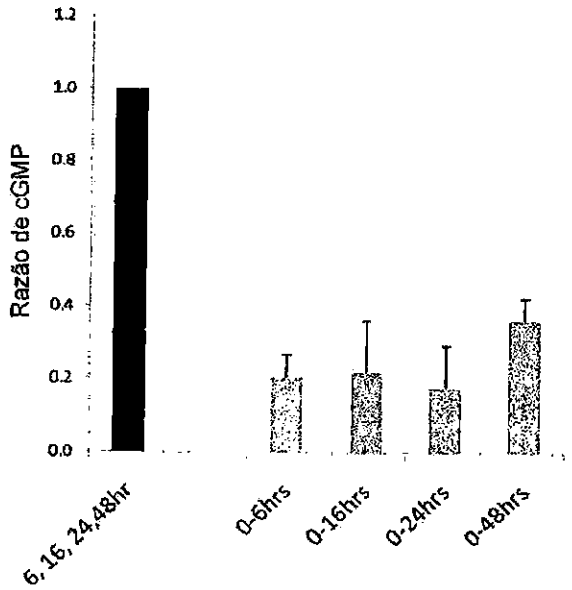
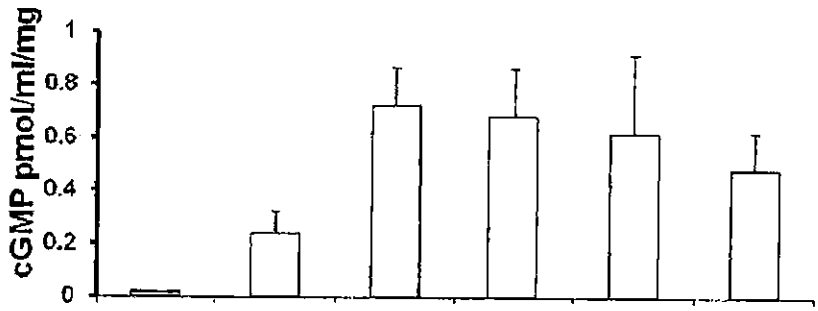

Razão de cGMP
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6, 16, 24,48hr
0-6hrs
0-16hrs
0-24hrs
0-48hrs

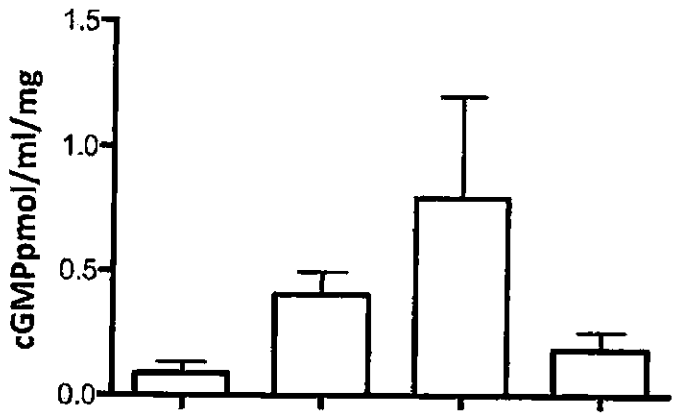
FIG. 75

A:




| No. de tratamentos diários: | 1 | 1 | 4 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ProCNP38 200nmol/kg: | - | + | + | + | + | + |

B:




| Tratamento único nos dias: | 1 | 1 | 1,2 | 1,3 |
|---|---|---|---|---|
| ProCNP38 200nmol/kg: | - | + | + | + |

FIG. 76

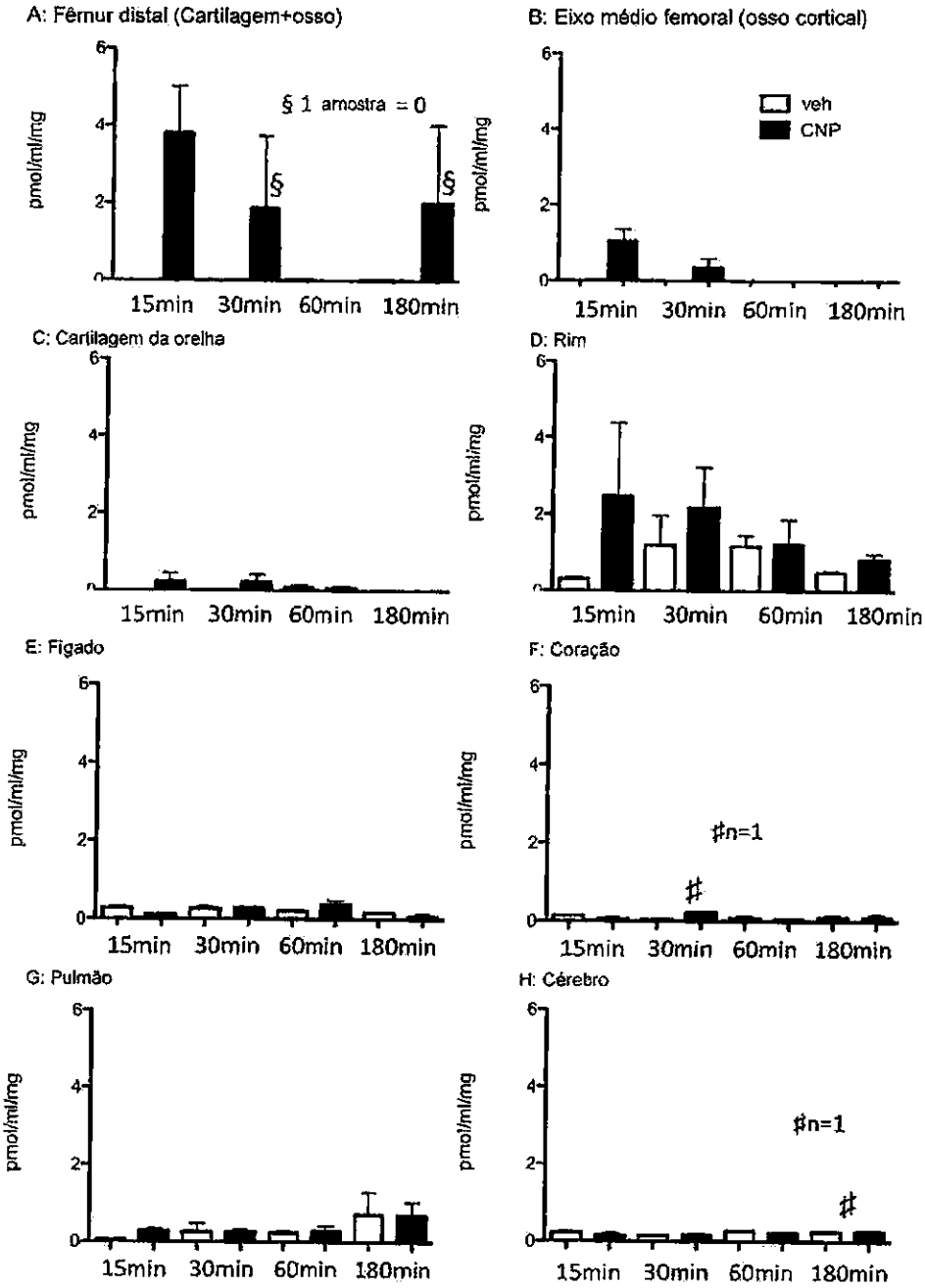

A: Fêmur distal (Cartilagem+osso)
§ 1 amostra = 0
pmol/ml/mg
15min 30min 60min 180min
B: Eixo médio femoral (osso cortical)
veh
CNP
C: Cartilagem da orelha
D: Rim
E: Fígado
F: Coração
♯n=1
G: Pulmão
H: Cérebro

FIG. 77

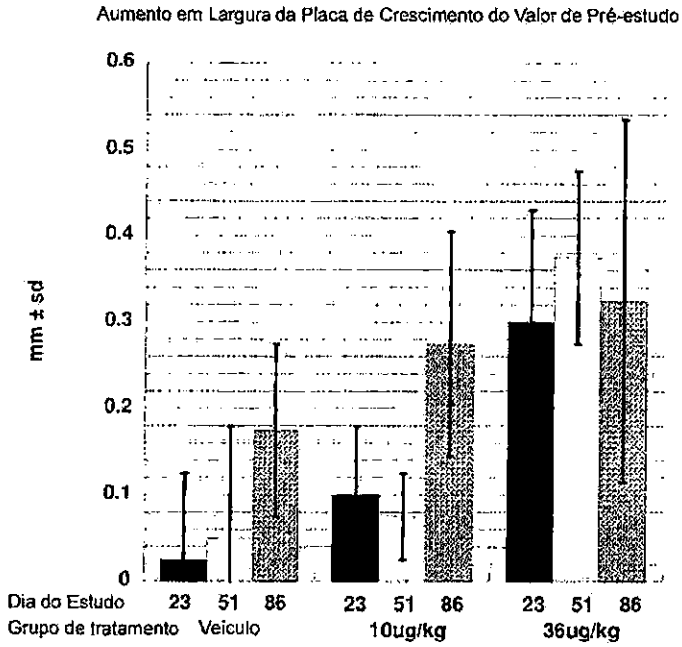

Aumento em Largura da Placa de Crescimento do Valor de Pré-estudo
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
mm ± sd
Dia do Estudo 23 51 86 23 51 86 23 51 86
Grupo de tratamento Veiculo 10ug/kg 36ug/kg

FIG. 79

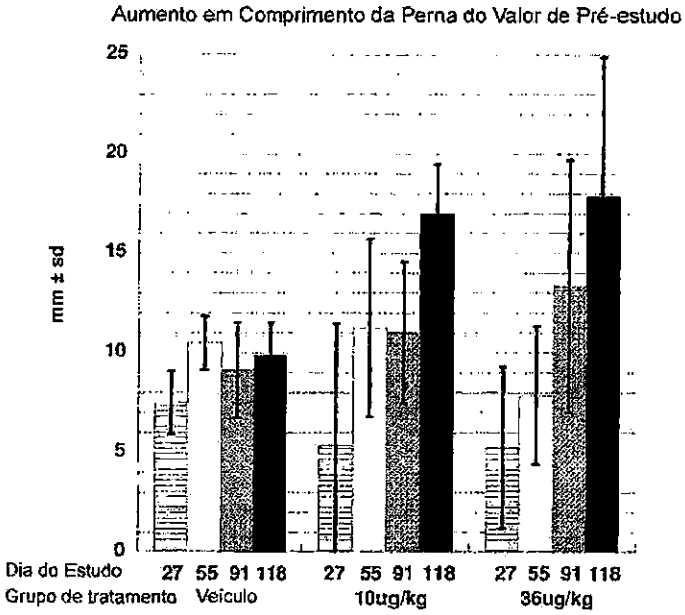
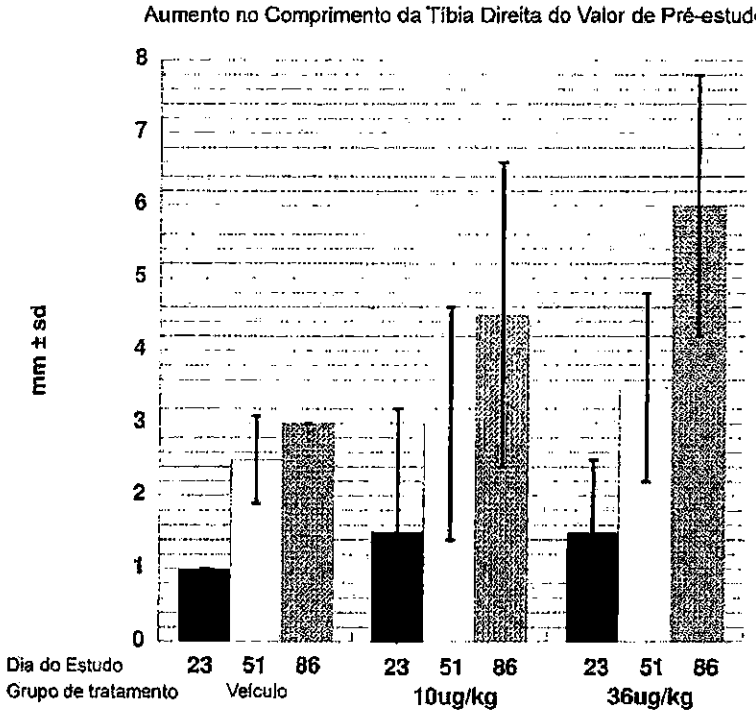

Aumento em Comprimento da Perna do Valor de Pré-estudo
25
20
15
10
5
0
mm ± sd
Dia do Estudo 27 55 91 118 27 55 91 118 27 55 91 118
Grupo de tratamento Veiculo 10ug/kg 36ug/kg

FIG. 78

A.


Aumento no Comprimento da Tíbia Direita do Valor de Pré-estudo
mm ± sd
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Dia do Estudo
23 51 86 23 51 86 23 51 86
Grupo de tratamento
Veículo
10ug/kg
36ug/kg

B.

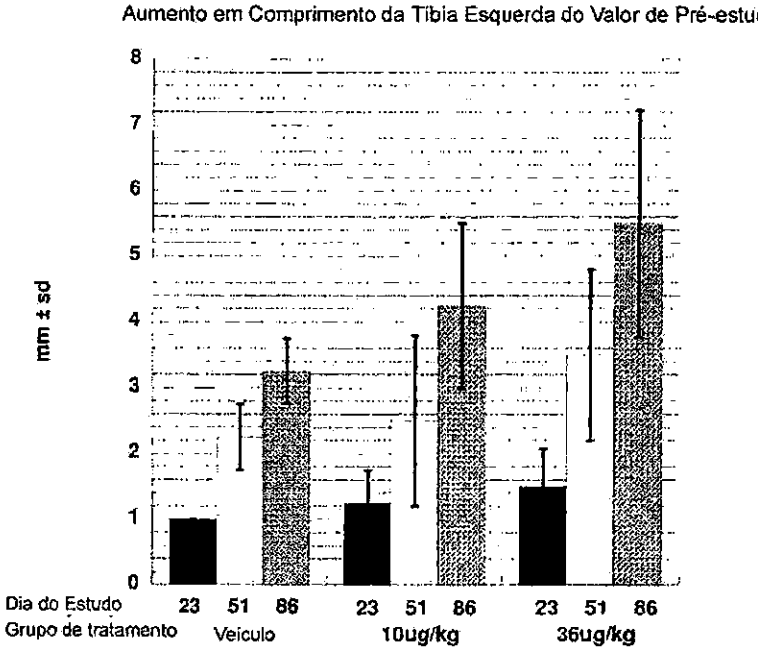

Aumento em Comprimento da Tíbia Esquerda do Valor de Pré-estudo
mm ± sd
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Dia do Estudo
23 51 86 23 51 86 23 51 86
Grupo de tratamento
Veículo
10ug/kg
36ug/kg

FIG. 80

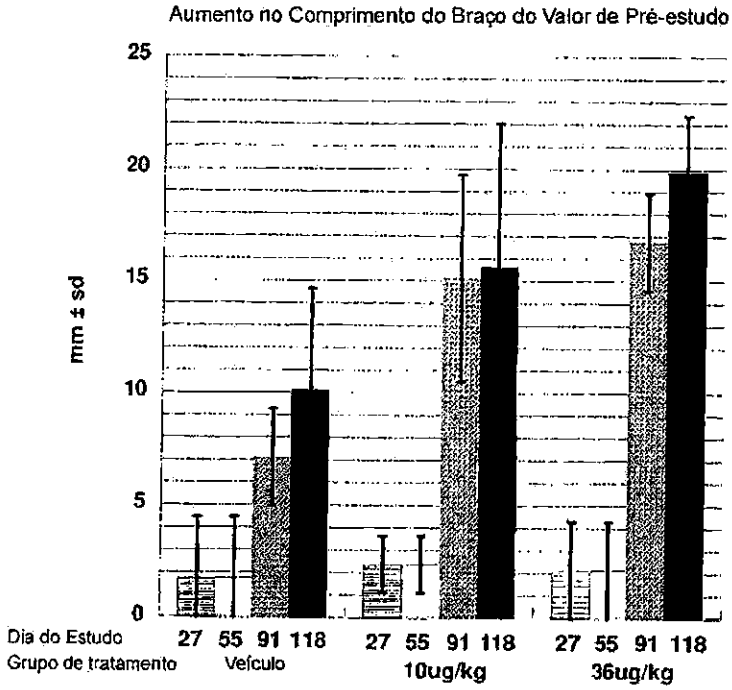

Aumento no Comprimento do Braço do Valor de Pré-estudo
mm ± sd
25
20
15
10
5
0
Dia do Estudo
27 55 91 118 27 55 91 118 27 55 91 118
Grupo de tratamento
Veículo
10ug/kg
36ug/kg

FIG. 81

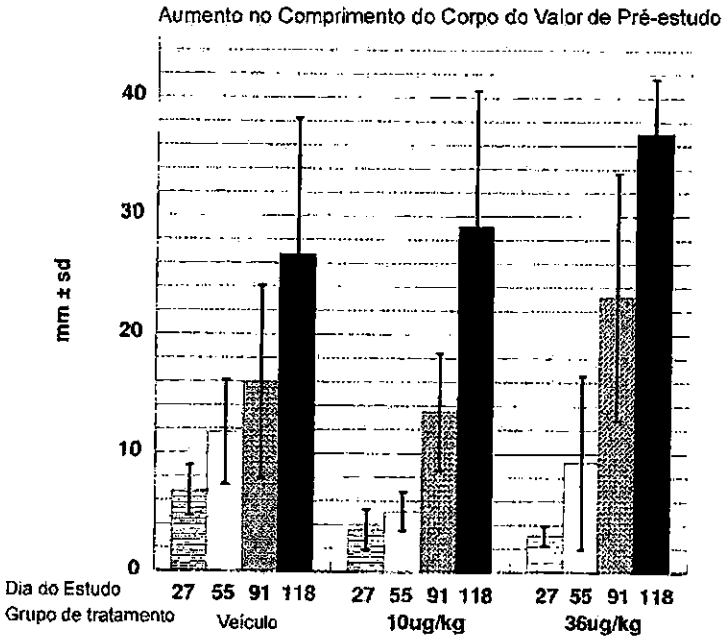

Aumento no Comprimento do Corpo do Valor de Pré-estudo
mm ± sd
40
30
20
10
0
Dia do Estudo
27 55 91 118 27 55 91 118 27 55 91 118
Grupo de tratamento
Veículo
10ug/kg
36ug/kg

FIG. 82

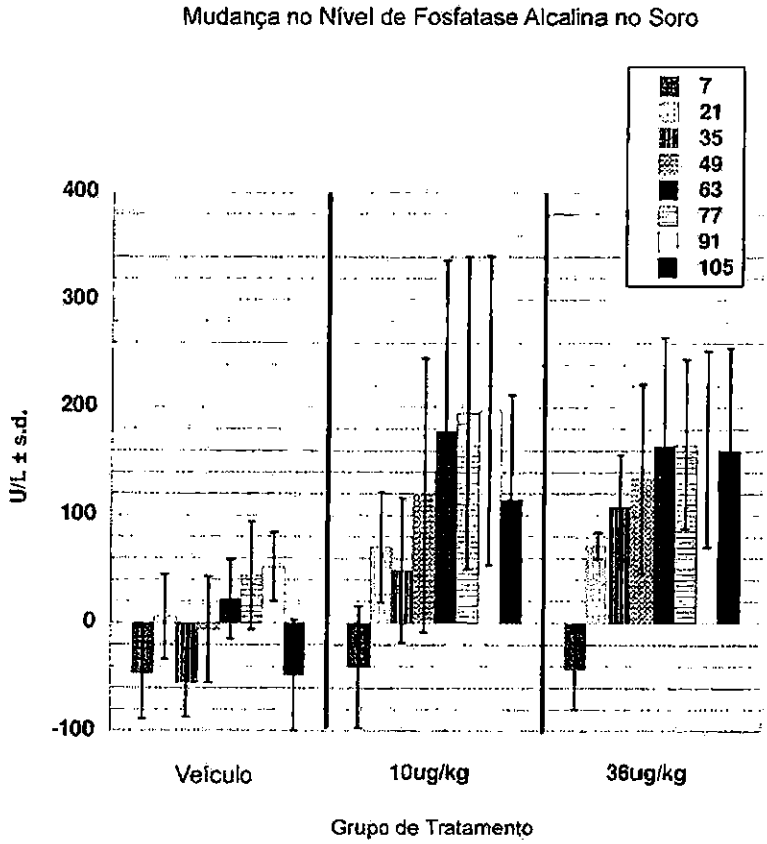
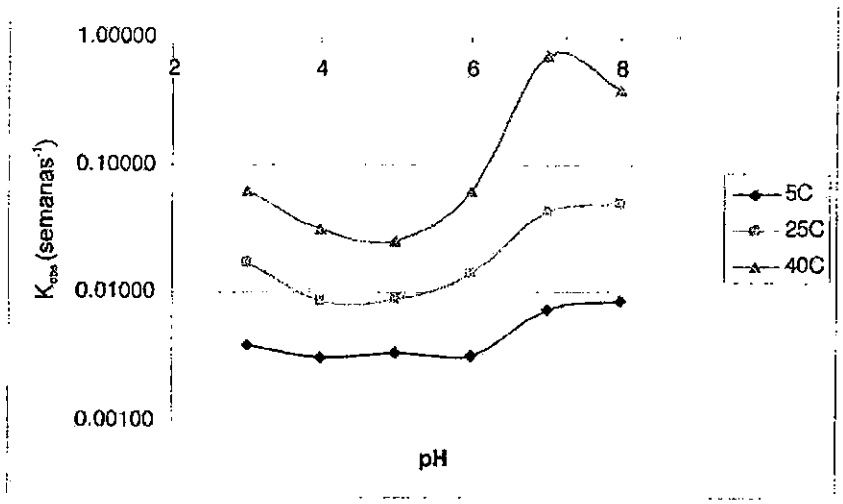

Mudança no Nível de Fosfatase Alcalina no Soro
7
21
35
49
63
77
91
105
400
300
200
100
0
-100
U/L ± s.d.
Veículo
10ug/kg
36ug/kg
Grupo de Tratamento

FIG. 83


1.00000
0.10000
0.01000
0.00100
$K_{obs}$ (semanas$^{-1}$)
2
4
6
8
pH
5C
25C
40C