



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202432171 A

(43)公開日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：112138123 (22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/22 (2006.01)* *A61K47/10 (2006.01)*
 A61K47/26 (2006.01) *A61K47/12 (2006.01)*
 A61K47/18 (2006.01) *A61K9/19 (2006.01)*
 A61K9/08 (2006.01) *A61P19/08 (2006.01)*

(30)優先權：2015/07/30 美國 62/199,081
 2016/04/11 美國 62/320,704

(71)申請人：美商拜奧馬林製藥公司 (美國) BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (US)
 美國

(72)發明人：布倫斯 雪莉 BULLENS, SHERRY (US)；邦廷 史都華 BUNTING, STUART
 (US)；周 天偉 CHOU, TIANWEI (US)；歐哈馬菲 奧古斯特 O OKHAMAFE,
 AUGUSTUS O. (US)；普萊斯 克里斯多佛 P PRICE, CHRISTOPHER P. (US)；
 溫特 丹尼爾 J WENDT, DANIEL J. (US)；葉 克拉倫斯 YAP, CLARENCE
 (US)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹；黃裕煦

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：61 項 圖式數：0 共 64 頁

(54)名稱
C 型利尿鈉肽變異體治療骨骼發育不良之用途

(57)摘要

本發明提供 C 型利尿鈉肽 (CNP) 之變異體以及包括 CNP 變異體肽之新穎醫藥組合物及調配物的用途，用於治療骨骼發育不良、骨骼發育不良之一或多種症狀（例如長骨生長或生長速度）以及具有骨骼發育不良及/或 CNP 相關症狀或組分之其他病症。

The present disclosure provides for use of variants of C-type natriuretic peptide (CNP), and novel pharmaceutical compositions and formulations comprising CNP variant peptides for the treatment of skeletal dysplasias, one or more symptoms of skeletal dysplasias, such as long bone growth or growth velocity, and other disorders having a skeletal dysplasia and/or CNP-associated symptom or component.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

C型利尿鈉肽變異體治療骨骼發育不良之用途

【英文發明名稱】

USE OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE VARIANTS TO
TREAT SKELETAL DYSPLASIA

【中文】

本發明提供C型利尿鈉肽（CNP）之變異體以及包括CNP變異體肽之新穎醫藥組合物及調配物的用途，用於治療骨骼發育不良、骨骼發育不良之一或多種症狀（例如長骨生長或生長速度）以及具有骨骼發育不良及/或CNP相關症狀或組分之其他病症。

【英文】

The present disclosure provides for use of variants of C-type natriuretic peptide (CNP), and novel pharmaceutical compositions and formulations comprising CNP variant peptides for the treatment of skeletal dysplasias, one or more symptoms of skeletal dysplasias, such as long bone growth or growth velocity, and other disorders having a skeletal dysplasia and/or CNP-associated symptom or component.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

C型利尿鈉肽變異體治療骨骼發育不良之用途

【英文發明名稱】

USE OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE VARIANTS TO
TREAT SKELETAL DYSPLASIA

【技術領域】

本發明一般係關於C型利尿鈉肽（CNP）變異體治療骨骼發育不良之用途以及CNP變異體肽之調配物。

【先前技術】

利尿鈉肽家族由三種結構上相關之肽組成：心房利尿鈉肽（ANP）（Genbank寄存編號NP_006163，針對ANP前驅蛋白，NPPA）、腦利尿鈉肽（BNP）（GenBank寄存編號NP_002512，針對BNP前驅蛋白，NPPB）以及C型利尿鈉肽（CNP）（《生物化學及生物物理學研究通訊（Biochem. Biophys. Res. Commun.）》，168: 863-870 (1990)（GenBank寄存編號NP_077720，針對CNP前去蛋白，NPPC）（《高血壓雜誌（J. Hypertens.）》，10: 907-912 (1992)）。此等小單鏈肽（ANP、BNP、CNP）具有17氨基酸環狀結構（Levin等人，《新英格蘭醫學期刊（N. Engl. J. Med.）》，339: 863-870 (1998)）且在多種生物過程中具有重要作用。ANP及BNP結合於亦稱為鳥苷醯基環化酶A（GC-A）的利尿鈉肽受體A（NPR-A）且將其活化，導致較高胞內環單磷酸鳥苷（cGMP）含量。同樣，CNP與NPR-B（GC-B）相互作用以促進產生cGMP（《高血壓雜誌》，10: 1111-1114 (1992)）。第三類型之受體

NPR-C以高親和力結合各利尿鈉肽且主要用於自胞外區室捕捉肽且將肽沈積到溶酶體中，其中肽在溶酶體中降解（科學《Science》，238: 675-678 (1987)）。ANP及BNP主要在心臟肌肉細胞內產生，並且認為在心血管穩態中起重要作用（科學《Science》，252: 120-123 (1991)）。CNP更廣泛表現於包含中樞神經系統、生殖道、骨骼及血管內皮中（《高血壓（Hypertension）》，49: 419-426 (2007)）。

在人類中，CNP最初以單鏈126氨基酸pre-pro多肽形式自利尿鈉肽前驅體C（NPPC）基因產生（《生物化學及生物物理學研究通訊》，168: 863-870 (1990)）。移除信號肽產生pro-CNP，且藉由內切蛋白酶furin進一步裂解產生活性53-胺基酸肽（CNP-53），其再次分泌及裂解產生成熟22胺基酸肽（CNP-22）（Wu, 《生物化學期刊（J. Biol. Chem.）》，278: 25847-852 (2003)）。CNP-53及CNP-22區別在於其分佈，CNP-53主要在組織中，而CNP-22主要存在於血漿及腦脊髓液中（《受體及信號轉導研究雜誌（J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res.）》，26: 269-297 (2006)）。軟骨中的主要CNP形式未知。CNP-53及CNP-22皆類似地結合於NPR-B。此外，其皆以劑量依賴性方式及類似方式誘發cGMP產生（VT Yeung, 《肽（Peptides）》，17: 101-106 (1996)）。

上文已描述天然CNP基因及多肽。美國專利第5,352,770號揭示按與人類CNP相同之順序自豬腦分離及純化CNP-22以及其治療心血管適應症之用途。美國專利第6,034,231號揭示proCNP之人類基因及多肽（126個氨基酸）以及人類CNP-53基因及多肽。

藉由膜結合之中性內肽酶（NEP）的作用（其快速降解CNP）（《生物化學雜誌（Biochem. J.）》，291 (Pt 1): 83-88 (1993)）且藉由

結合於CNP且將CNP沈積至降解CNP的溶酶體中的NPR-C自胞外空間清除CNP。CNP已顯示在正常人類中具有2.6分鐘的活體內半衰期（《臨床內分泌與代謝雜誌（J. Clin. Endocrinol. Metab.）》，78: 1428-35 (1994)）。CNP之低血漿濃度（《骨骼礦物質研究雜誌（J. Bone Miner. Res.）》，19 (增刊1)S20 (2004)）及其與NPR-B在許多組織中的共同表現表明CNP主要藉由自分泌/旁分泌機制起作用。

如上所述，CNP結合且活化亦稱為鳥苷酸環化酶B（GC-B）的利尿鈉肽受體B（NPR-B），導致較高胞內環單磷酸鳥苷（cGMP）含量。cGMP產生介導之下游信號傳導影響許多不同生物過程，包含軟骨內骨化。因此，此路徑中任何組分的含量升高或降低可導致異常骨骼或軟骨生長。舉例而言，小鼠模型中基因敲除CNP或NPR-B導致矮化表型之動物具有較短長骨及脊椎。已鑑別出阻斷適當CNP信號傳導之人類NPR-B突變且其導致侏儒症（Olney等人，《臨床內分泌與代謝雜誌》91(4): 1229-1232 (2006)；Bartels等人，《美國人類遺傳學雜誌（Am. J. Hum. Genet.）》75: 27-34 (2004)）。相比之下，經工程改造以產生升高含量之CNP的小鼠展現延長的長骨及脊椎。

軟骨發育不全為纖維母細胞生長因子受體3（FGFR-3）之基因中常染色體顯性遺傳突變的結果，此導致軟骨形成異常。FGFR-3對軟骨細胞生長通常具有負調節作用，且因此對骨骼生長具有負調節作用。在軟骨發育不全中，FGFR-3之突變形式為組成性活性的，導致骨骼嚴重縮短。軟骨細胞增殖及分化似乎皆受干擾，導致明顯短的生長板軟骨（P. Krejci等人，《細胞科學雜誌（J. Cell Sci.）》118: 5089-5100 (2005)）。軟骨內骨化為控管縱向長骨生長的過程。生長板具有四個區-休眠、增生、肥大

和鈣化區。在生長板中，**NPR-B**由增殖細胞表現，而**NPR-C**由肥大細胞表現（**Yamashite**等人，《生物化學雜誌》 127: 177-179 (2000)）。在正常軟骨內骨骼生長中，軟骨細胞編組成柱且在生長板的增殖區增殖。軟骨發育不全患者中的此等柱錯亂。另外，肥大區為細胞變大且最終細胞凋亡（溶解），導致骨細胞侵入且礦化的區域。軟骨發育不全患者中肥大軟骨細胞及區域整體尺寸比正常患者中小得多。**CNP**為**NPR-B**之促效劑，軟骨細胞及骨骼生長之正調控劑。**CNP/NPR-B**之下游信號傳導在有絲分裂原活化之蛋白激酶（**MAP K**）水準上抑制**FGFR-3**路徑。**MAP K**抑制促進生長板之增殖區及肥大區中軟骨細胞增殖及分化，導致骨骼生長。

在人類中，**FGFR-3**之活化突變為遺傳性侏儒症的主要起因。具有活化**FGFR-3**之小鼠用作軟骨發育不全（骨骼發育不良的最常見形式）之模型，且**CNP**之過度表現拯救此等動物免遭侏儒症。因此，**CNP**及**CNP**之功能變體為治療多種骨骼發育不良的可能性療法。

CNP之治療性用途目前受其短血漿半衰期限制，其短血漿半衰期已顯示在人類活體內為2.6分鐘（《臨床內分泌與代謝雜誌》，78: 1428-35 (1994)）。為了增加**CNP**濃度高於人類血漿中通常存在之固有含量（約5 pM），使用全身性投與之**CNP**的全部人類及動物研究中已必需連續輸注。人類血漿中**CNP**之半衰期降低的兩種機制為藉由中性內肽酶（**NEP**）分解及藉由利尿鈉肽受體**C**（**NPR-C**）清除（生長激素及**IGF**研究（**Growth Horm. & IGF Res.**），16: S6-S14 (2006)）。具有較長活體內血清半衰期且展示與野生型**CNP**類似或改良之活性的**CNP**變異體對於可持續治療性策略是重要的。

已評估**CNP**之多種類似物及衍生物的生物學活性。參看例如美國專

利7,276,481；PCT公開案第WO 94/20534號，其揭示CNP-22與ANP之5-胺基酸C端的嵌合體，命名為血管鈉肽（VNP）。美國專利8,198,242及8,598,121揭示CNP變異體治療骨骼發育不良，諸如軟骨發育不全之用途。美國專利7,642,243及8,658,373描述CNP-22或CNP-53之變異體治療關節炎之用途。

【發明內容】

本發明係關於當CNP變異體肽高於某一劑量及/或低於本文所述之某一藥物投與方案投與時，CNP變異體肽用於治療骨骼發育不良、治療一或多種骨骼發育不良相關症狀或改良罹患骨骼發育不良之個體體內骨骼發育不良的一或多種後果或生理學症狀的用途。本文揭示投與CNP變異體肽可導致軟骨發育不全個體中生長速度改良。在多個實施例中，CNP變異體肽為CNP-38或Pro-Gly-CNP-37。

在多個實施例中，本發明提供一種治療骨骼發育不良之方法，其包括向有需要之個體投與包括CNP變異體肽之組合物，投與量為至少7.5 $\mu\text{g/kg}$ ，其中所述投與治療骨骼發育不良或改良骨骼發育不良的至少一種症狀或生理學後果。

在一個實施例中，治療為一或多種選自由以下組成之群的骨骼發育不良的症狀的改良：絕對生長增加、生長速度改良或增加、QCT骨礦物質密度（BMD）增加、生長板形態改善、長骨生長增加、脊柱形態改善、肘關節運動範圍改善或增加以及睡眠呼吸暫停減少。

在一個實施例中，骨骼發育不良選自由以下組成之群：軟骨發育不全、軟骨生成減退、身材矮小、侏儒症、骨軟骨發育不良、致死性骨發育不良、成骨不全、軟骨成長不全、點狀軟骨發育不良、純合軟骨發育不

全、點狀軟骨發育不良、屈肢骨發育不良、先天性致死型低磷酸酯酶症、圍產期致死型成骨不全、短肋多指畸形症候群、軟骨生成減退、肢根型點狀軟骨發育不良、揚森型幹骺端發育不良（**Jansen-type metaphyseal dysplasia**）、先天性脊椎骨骺發育不良、骨發育不全症、扭曲性骨發育不良、先天性股骨短、蘭格型肢中骨發育不良（**Langer-type mesomelic dysplasia**）、尼維格型肢中骨發育不良（**Nievergelt-type mesomelic dysplasia**）、羅比撓症候群（**Robinow syndrome**）、萊因哈特症候群（**Reinhardt syndrome**）、肢端發育不全、周圍骨發育障礙、凱乃斯特發育不良（**Kniest dysplasia**）、纖維軟骨生成、羅伯茨症候群（**Roberts syndrome**）、肢端肢中發育不全、小肢畸形、莫基奧症候群（**Morquio syndrome**）、凱乃斯特症候群、幹骺端骨發育不良以及脊椎幹骺端發育不良。在一較佳實施例中，骨骼發育不良為軟骨發育不全。

亦提供一種增加個體體內長骨生長之方法，其包括向有需要之個體投與包括**CNP**變異體肽之組合物，投與量為至少**7.5 µg/kg**，其中所述投與增加長骨生長。在一個較佳實施例中，個體患有軟骨發育不全。

本發明亦涵蓋一種提高或增加個體體內生長的速度（即生長速度）之方法，其包括向有需要之個體投與包括**CNP**變異體肽之組合物，投與量為至少**7.5 µg/kg**，其中所述投與提高或增加個體中之生長速度。在一個較佳實施例中，個體患有軟骨發育不全。在多個實施例中，生長速度之提高或增加為以個體中相對於基線改變**25%-50%**範圍內的按年計算之生長速度增加。在一個實施例中，生長速度之提高或增加為以個體中相對於基線改變至少約**25%**，更佳至少約**40%**的按年計算之生長速度增加。

預期生長速度增加可藉由量測站立高度、坐高、體重、頭圍、上臂

長度、下臂長度、大腿長度、小腿長度、手長及/或腳長來評定。

在本文所述之多種方法及組合物中，CNP變異體肽可選自由以下組成之群：

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37；SEQ ID NO:2)；

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37；SEQ ID NO:3)；

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37 (M32N)；SEQ ID NO:4]；

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5)；

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:6)；以及

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP-37或CNP-38；SEQ ID NO:7)。

在多個較佳實施例中，CNP變異體肽為CNP-38或Pro-Gly-CNP-37。

在本文所述之多種方法中，所投與的CNP變異體肽之量在約7.5 µg/kg至約100 µg/kg範圍內，較佳約7.5 µg/kg至約80 µg/kg範圍內，更佳約7.5 µg/kg至約60 µg/kg範圍內。在多個實施例中，所投與之CNP變異體肽之量為至少約7.5 µg/kg、至少約15 µg/kg、至少約30 µg/kg或至少約60 µg/kg。

在本文所述之多種方法中，**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物皮下或非經腸投與，較佳皮下投與。亦預期**CNP**變異體肽藉由其他途徑投與。例示性投與途徑包含（但不限於）皮下、關節內、靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮內、鞘內、腹膜內、肌肉內、皮內、鞘內、局部、經皮或經黏膜投與。

在本文所述之多種方法中，**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物以單次治療或分多次劑量向個體投與。多個劑量可每日投與一次，或在處理過程中分多次劑量投與。在多個實施例中，預期**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物以單次劑量或分多個劑量每日、每隔一天、每3天、每週2次、每週3次、每週、每兩週、每3週、每月、每6週、每2個月、每3個月或治療醫師認為適當的其他間隔投與。在尤其較佳實施例中，**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物每日一次向個體投與持續至少一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月、七個月、八個月、九個月、十個月、十一個月、十二個月或更長時段。

在本文所述方法之某些實施例中，調整**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物的投與以允許預防性或治療性治療時段，繼之以恢復時段。舉例而言，**CNP**變異體肽或包括其之組合物或調配物可以關節內、皮下、靜脈內，或藉由另一模式每日投與或每週多次投與持續一段時間，繼之以無治療時段，接著重複所述循環。在一些實施例中，初始治療時段（例如每日投與或每週多次投與**CNP**變異體肽）持續3天、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週或12週。在一個相關實施例中，無治療時段持續3天、1週、2週、3週或4週。在某些實施例中，**CNP**變異體肽之給藥方案為每日投與持續3天，繼之以3天停藥；或每日投與或

每週多次投與持續1週，繼之以3天或1週停藥；或每日投與或每週多次投與持續2週，繼之以1週或2週停藥；或每日投與或每週多次投與持續3週，繼之以1週、2週或3週停藥；或每日投與或每週多次投與持續4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週或12週，繼之以1週、2週、3週或4週停藥。

在本文所述之多種方法中，CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物的投與較佳不會在個體中引起或導致評分爲二級或更高級別的不良事件。在本文所述方法之其他實施例中，投與CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物不導致所述個體中血液中血紅蛋白濃度、血液中血小板數目、血液電解質濃度、血液脲氮濃度、血液肌酐濃度、血液鹼性磷酸酶濃度、血液丙胺酸轉胺酶濃度及/或血液天冬胺酸轉胺酶濃度的臨床顯著改變。

在本文所述之多種方法中，在較佳實施例中，投與CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物導致（i）上半身長度比下半身長度比率，（ii）上臂長度比前臂長度比率，或（iii）大腿長度比小腿長度比率相較於基線（即在投與CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物之前）的改變介於約-0.25與約0.25之間、介於約-0.20與約0.20之間、介於約-0.15與約0.15之間、介於約-0.10與約0.10之間或介於約-0.05與約0.05之間。

在多個實施例中，本發明提供包括CNP變異體肽之組合物或調配物，或包括CNP變異體肽之組合物或調配物在本文所述方法中之用途。在一個實施例中，組合物或調配物進一步包括醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑。在某些實施例中，組合物由液體或凍乾調配物製備，所述調配物包括pH為約4至約6的檸檬酸/檸檬酸鹽緩衝液或乙酸/乙酸鹽緩衝液。在多個實施例中，pH為約5.5。

亦涵蓋如本文所述之治療方法，其進一步包括投與第二試劑。

在多個實施例中，本文所述之方法及組合物或調配物中所用之CNP變異體肽可連接至一種疏水性酸，且可連接至一或多種疏水性酸。疏水性酸之非限制性實例包含直鏈或分支鏈飽和或不飽和C₅-C₁₂羧酸（例如戊酸、庚酸等）及天然脂肪酸。疏水性酸可連接於一或多個胺基酸殘基之N端、C端及/或側鏈。在一個實施例中，疏水性酸結合於N端。

在另一實施例中，本發明之方法及組合物中所用之CNP變異體肽為嵌合體或融合蛋白（包括CNP變異體肽及可裂解肽或蛋白質或肽標籤）。例示性可裂解蛋白質或肽包含（但不限於）組胺酸（例如六-His）標籤；TAF12：人類轉錄因子TAF12；KSI：酮類固醇異構酶；MBP：麥芽糖-結合蛋白；β-Gal：β-半乳糖；GST：麩胱甘肽-S-轉移酶；Trx：硫氧還蛋白；CBD：幾丁質結合域；BMPM：BMP-2突變、SUMO、CAT、TrpE、葡萄球菌蛋白質A、鏈球菌蛋白質、澱粉結合蛋白、內切葡聚糖酶A之纖維素結合域、外切葡聚糖酶Cex之纖維素結合域、生物素結合域、recA、Flag、c-Myc、聚(His)、聚(Arg)、聚(Asp)、聚(Gln)、聚(Phe)、聚(Cys)、綠色螢光蛋白、紅色螢光蛋白、黃色螢光蛋白、強化型藍螢光蛋白、生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白鏈菌素、抗體抗原決定基以及其片段。

在本文所述之多個實施例中，CNP變異體肽可為單體或二聚體。在一個相關實施例中，二聚CNP變異體肽之單體可經連接基團或不經連接基團N端連接至N端、經連接基團或不經連接基團N端連接至C端或經連接基團或不經連接基團C端連接至C端。

在本文所揭示之任何實施例中，CNP變異體肽可具有相比於野生型

CNP-22實質上相同或更好的生物活性。舉例而言，例如關於與NPR-B (GC-B)之相互作用以促進cGMP產生，CNP變異體肽可保留至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高野生型CNP-22活性，或可具有比CNP-22更高之活性。或者或另外，關於調節軟骨內骨骼生長及軟骨細胞活性，包含（但不限於）軟骨細胞增殖、軟骨細胞分化、抑制有絲分裂原活化之蛋白（MAP）激酶/MEK（Raf-1）激酶信號傳導路徑，以及促進軟骨內骨化，CNP變異體肽可保留至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高野生型CNP-22活性，或可具有比CNP-22更高之活性。在本文所述之任一實施例中，CNP變異體肽可包括與野生型CNP-22之胺基酸6-22或1-22至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高相同或同源之胺基酸序列。

在多個實施例中，CNP變異體肽可視情況在N及/或C端具有結合或擴展以促進軟骨靶向、降低腎清除率及/或提高對NEP分解之抗性。此類結合或擴展可包括自例如聚Asp、聚Glu、軟骨靶向肽、唾液蛋白、PEG、碳水化合物、疏水性酸、NPPC或非-CNP（多）肽或其組合形成或衍生之分子或序列。

另外預期CNP變異體肽可結合於疏水性聚合或非聚合部分，諸如庚酸、戊酸或脂肪酸。疏水性部分可結合於胺基酸殘基（包含（但不限於）離胺酸、絲胺酸、半胱胺酸或蘇胺酸）之側鏈，或可連接於CNP變異體之N端及/或C端。

在多個實施例中，適用於所述方法之CNP變異體肽具有約8至約10.5或約8.5至約10範圍內之 π 。

在多個實施例中，本發明提供一種醫藥組合物之用途，所述醫藥組

合物包括CNP變異體肽、視情況選用之另一生物活性劑以及視情況選用之醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑。在多個實施例中，組合物為適於非經腸注射之無菌醫藥組合物。在一些實施例中，組合物包括實質上純CNP變異體肽，例如至少約90%或95%純。在一些實施例中，組合物含有小於約5%、4%、3%、2%、1%或0.5%污染物，諸如其他人類蛋白質、豬蛋白質或CNP-53或其片段（除所要CNP變異體肽以外）。在多個實施例中，向個體投與無菌組合物以治療或預防骨骼發育不良或本文所揭示之骨骼發育不良之一或多種症狀或生理學後果。

本文適用之CNP變異體肽有利地保留CNP活性且展現增加之血清半衰期。CNP活性之保留可例如顯示為在相同濃度下（例如1 μ M CNP肽或大於ED80），保留所要活體內生物學作用或保留至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%或至少約100%CNP-22的cGMP刺激活性。在一些實施例中，CNP變異體肽展現血清半衰期相較於CNP-22增加至少約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍或40倍。

在一個相關實施例中，本文所述之CNP變異體肽具有增加的NEP抗性且與野生型CNP-22相比展現增加之半衰期。在一個實施例中，CNP變異體肽之半衰期相較於野生型CNP-22增加約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或約100%。

亦涵蓋前述CNP變異體肽或本文所述的包括其之組合物或調配物中之任一者製備用於治療骨骼發育不良及本文所述的與骨骼發育不良有關的症狀或其他生理學表現的用途。亦涵蓋注射器（例如單次使用或預填充注射器）、無菌密封容器（例如小瓶、瓶子、容器）及/或套組或封裝，其

包括前述CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物中之任一者，視情況具有適合使用說明書。

本文亦涵蓋調配物，其包括（a）本文所述之CNP變異體肽及（b）一或多種選自由以下組成之群的組分：緩衝劑、等張劑、穩定劑及抗吸附劑。在尤其較佳實施例中，調配物中採用之緩衝劑可為單水合檸檬酸、二水合檸檬酸鈉或兩者之組合。在其他較佳實施例中，本發明之調配物中採用的等張劑可為二水合海藻糖、D-甘露糖醇或兩者之組合。在其他較佳實施例中，本發明之調配物中採用的穩定劑為L-甲硫胺酸。在其他較佳實施例中，本發明之調配物中採用的抗吸附劑為聚山梨醇酯80。

在多個實施例中，本發明之調配物經凍乾、為液體形式或已從事先凍乾形式復原的液體形式。在某些實施例中，本發明之調配物不含防腐劑且視情況可含於1型未經處理之硼矽酸玻璃小瓶中。視情況而言，本發明之調配物具有介於約5.0至約6.0範圍內，較佳約5.5的pH。

在其他實施例中，本發明之調配物包括濃度為至少約2.0 mg/ml、5.0 mg/ml、10.0 mg/ml或更高的CNP變異體肽。在一個尤其較佳實施例中，本發明之調配物包括濃度為約10.0 mg/ml的CNP變異體肽。在尤其較佳實施例中，調配物的CNP變異體肽為CNP-38或Pro-Gly-CNP-37。

在其他實施例中，本發明的調配物包括如本文所述之CNP變異體肽、單水合檸檬酸、二水合檸檬酸鈉、二水合海藻糖、D-甘露糖醇、L-甲硫胺酸以及聚山梨醇酯80。在某些較佳實施例中，CNP變異體肽以介於約2.0 mg/ml與約10.0 mg/ml之間的濃度存在，單水合檸檬酸以介於約0.15 mg/ml與約0.40 mg/ml之間的濃度存在，二水合檸檬酸鈉以介於約0.5 mg/ml與約1.5 mg/ml之間的濃度存在，二水合海藻糖以介於約30

mg/ml與約70 mg/ml之間的濃度存在，D-甘露糖醇以介於約10 mg/ml與約20.0 mg/ml之間的濃度存在，L-甲硫胺酸以介於約0.5 mg/ml與約1.5 mg/ml之間的濃度存在且聚山梨醇酯80以介於約0.01 mg/ml與約0.1 mg/ml之間的濃度存在。在一個尤其較佳實施例中，CNP變異體以約10.0 mg/ml之濃度存在，單水合檸檬酸以約0.28 mg/ml之濃度存在，二水合檸檬酸鈉以約1.08 mg/ml之濃度存在、二水合海藻糖以約58.01 mg/ml之濃度存在，D-甘露糖醇以約15.0 mg/ml之濃度存在，L-甲硫胺酸以約0.73 mg/ml之濃度存在且聚山梨醇酯80以約0.05 mg/ml之濃度存在。

本文所述的含有CNP變異體肽之調配物適用且可用於本文所述之多種方法中。

應理解本文所述之各特徵或實施例或組合為本發明態樣中任一者的非限制性說明性實例，且同樣意謂可與本文所述之任何其他特徵或實施例或組合進行組合。舉例而言，若特徵用諸如「一個實施例」、「一些實施例」、「另一實施例」、「特定例示性實施例」及/或「另一實施例」的措辭描述，則此等類型之實施例中之每一個為特徵的非限制性實例，其打算與本文所述的任何其他特徵或特徵組合進行組合，而不必列出每一個可能組合。此類特徵或特徵組合適用於本發明態樣中之任一者。當揭示落在範圍內的實例值時，預期此等實例中任一者儘可能為範圍的端點，預期在此類端點之間的任何及所有數值，且預想上端點及下端點的任何及所有組合。

【實施方式】

本發明係關於使用CNP變異體肽治療骨骼發育不良、骨骼發育不良的一或多種症狀或生理學後果及具有骨骼發育不良及/或CNP相關症狀或

組分的其他病症的方法。本發明亦係關於包括CNP變異體肽之組合物及調配物以及此類組合物或調配物用於治療骨骼發育不良或骨骼發育不良的症狀或生理學後果、增加有需要個體之長骨生長，或改善或增加有需要個體之生長速度的方法，所述有需要個體例如罹患骨骼發育不良之個體。

A. 定義

除非另外說明，否則用於本申請案（包含說明書及申請專利範圍）之以下術語具有下文給出之定義。

如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，除非上下文另外明確規定，否則不定冠詞「一（a）」及「一（an）」以及定冠詞「所述（the）」包括複數以及單數指示物。

術語「約」或「大約」意謂如由一般熟習此項技術者所測定之特定值的可接受誤差，其部分取決於如何量測或測定所述值。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在1、2、3或4個標準差內。在某些實施例中，術語「約」或「大約」意謂在既定值或範圍的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.05%內。當術語「約」或「大約」冠於一系列兩個或更多個數值中的第一數值之前時，應理解術語「約」或「大約」適用於所述系列中之每一個數值。

標準化學術語之定義可見於參考著作中，包含Carey及Sundberg之《高等有機化學（Advanced Organic Chemistry）》，第3版，第A及B卷（紐約普萊紐姆出版社（Plenum Press, New York）1992）。除非另外指示，否則本發明的實踐可採用此項技術內的特定習知方法：合成有機化學方法、質譜法、預備型及分析型色譜法、蛋白質化學方法、生物化學法、

重組DNA技術以及藥理學。參看例如T.E. Creighton,《蛋白質：結構及分子特性 (Proteins: Structures and Molecular Properties)》(W.H.費曼公司 (W.H. Freeman and Company), 1993); A.L. Lehninger,《生物化學 (Biochemistry)》(沃茨出版公司 (Worth Publishers, Inc.), 第4版, 2004); Sambrook等人,《分子選殖：實驗室手冊 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》(第2版, 1989);《酶學方法 (Methods In Enzymology)》(S. Colowick及N. Kaplan編, 學術出版公司 (Academic Press, Inc.));《雷明頓醫藥科學 (Remington's Pharmaceutical Sciences)》, 第18版 (賓夕法尼亞州伊斯頓：馬克出版公司 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company), 1990)。

本文引用之全部公開案、專利及專利申請案 (不管上文或下文) 以全文引用的方式併入本文中。

本文全文中使用以下胺基酸縮寫：

丙胺酸：Ala (A)	精胺酸：Arg (R)
天冬醯胺：Asn (N)	天冬胺酸：Asp (D)
半胱胺酸：Cys (C)	麩醯胺酸：Gln (Q)
麩胺酸：Glu (E)	甘胺酸：Gly (G)
組胺酸：His (H)	異白胺酸：Ile (I)
白胺酸：Leu (L)	離胺酸：Lys (K)
甲硫胺酸：Met (M)	苯丙胺酸：Phe (F)
脯胺酸：Pro (P)	絲胺酸：Ser (S)
蘇胺酸：Thr (T)	色胺酸：Trp (W)
酪胺酸：Tyr (Y)	纈氨酸：Val (V)

本文使用習知標記描繪多肽及肽序列：多肽或肽序列之左端為胺基末端；多肽序列之右端為羧基末端。

在一個實施例中，適用於所述方法的本文所述之CNP變異體肽使用編碼CNP變異體肽之聚核苷酸經重組方式產生。此類聚核苷酸表現之CNP變異體肽可藉由以下方法產生，包含在適於表現編碼CNP變異體之聚核苷酸的條件下使宿主細胞在培養基中生長，且自宿主細胞或培養基分隔表現產物。視任何轉譯後處理而定，實際表現產物與編碼之蛋白質產物可略微不同。用於製造本發明之CNP變異體肽之方法至少揭示於美國專利第8,198,242號中，其以引用的方式併入本文中。

在兩個或更多個聚核苷酸或多肽序列的情形中，術語「相同」及「一致性」百分比係指如使用以下序列比較算法中之一者或藉由目測量測，當針對最大對應性比較及比對時，兩個或更多個序列或子序列相同或其中指定百分比的核苷酸或胺基酸殘基相同。

在兩種核酸或多肽之情形中，片語「實質上同源」或「實質上相同」一般係指如使用以下序列比較算法中之一者或藉由目測量測，當針對最大對應性比較及比對時，兩個或更多個序列或子序列具有至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或98%核苷酸或胺基酸殘基一致性。在某些實施例中，至少約25、50、100或150個殘基長度的序列區域上存在實質上同源或一致性。在另一實施例中，序列在任一個或兩個比較生物聚合物的整個長度上實質上同源或相同。

對於序列比較，通常一個序列充當與測試序列比較的參考序列。使用序列比較算法時，將測試及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列座標，且指定序列算法程式參數。接著，序列比較算法基於所指定之程式參

數來計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

可例如藉由 Smith 及 Waterman, 《高等應用數學 (Adv. Appl. Math.)》, 2: 482 (1981)之局部同源算法、Needleman及Wunsch, 《分子生物學雜誌 (J. Mol. Biol.)》, 48: 443 (1970)之同源比對算法、Pearson 及Lipman, 《美國國家科學院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》之相似性方法檢索, 85: 2444 (1988)、此等算法之電腦化執行 (威斯康星遺傳軟體包 (Wisconsin Genetics Software Package), 遺傳學電腦小組 (Genetics Computer Group), 575名科學博士, 威斯康星州麥迪遜 (Madison, WI) 中的GAP、BESTFIT、FASTA以及TFASTA) 或藉由目測進行用於比較之序列的最佳比對。適用算法的一個實例為PILEUP, 其使用Feng及Doolittle, 《分子分類雜誌 (J. Mol. Evol.)》, 35: 351-360 (1987)之漸近比對法且類似於Higgins及Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989)所述之方法。適用於產生多個序列比對之另一算法為Clustal W (Thompson等人, 《核酸研究 (Nucleic Acids Research)》, 22: 4673-4680 (1994))。適於測定序列一致性百分比及序列相似性百分比之算法的實例為BLAST算法 (Altschul等人, 《分子生物學雜誌》, 215: 403-410 (1990); Henikoff及Henikoff, 《美國國家科學院院刊》, 89: 10915 (1989); Karlin及Altschul, 《美國國家科學院院刊》, 90: 5873-5787 (1993))。進行BLAST分析之軟體可經國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information) 公開獲得。

「野生型」(wt)為指物種中聚核苷酸、多肽或蛋白質的天然形式 (包含序列) 之術語。野生型形式與遺傳學突變引起的聚核苷酸、多肽或蛋白質的突變形式不同。

在一個實施例中，為第二肽之「類似物」或「變異體」或「衍生物」的第一肽為與第二肽具有至少約50%、60%或70%序列同源性，但小於100%序列同源性的肽。此類類似物、變異體或衍生物可包括非天然存在之胺基酸殘基，包含（但不限於）高精胺酸、鳥胺酸、青黴胺及正纈胺酸，以及天然存在的胺基酸殘基。

利尿鈉肽前驅體C（NPPC）多肽為單鏈126胺基酸pre-pro多肽，且其裂解時最終產生野生型CNP-22（wtCNP-22）。自NPPC移除信號肽產生pro-CNP，且藉由內切蛋白酶furin進一步裂解產生活性53胺基酸肽（CNP-53），其再次分泌及裂解產生成熟22胺基酸肽（CNP或CNP-22）。在一個實施例中，「CNP變異體肽」與野生型NPPC在相同數目之胺基酸殘基上至少約40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同源。進一步預期CNP變異體肽可包括約1至約53，或1至38，或1至37，或1至35，或1至31，或1至27，或1至22，或10至35，或約15至約37個NPPC多肽殘基。在一個實施例中，CNP變異體可包括具有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或53個源自NPPC多肽之胺基酸的序列。

術語「有效量」意謂足以對個體之健康狀況、病變或疾病產生所要結果或足以用於診斷目的之劑量。所要結果可包括劑量之接受體的主觀或客觀改善。「治療有效量」係指對健康有效產生預期有益作用的試劑的量。在任何個別情況下之適當「有效」量可由一般技術人員使用常規實驗來測定。應理解，針對任何具體患者之特定劑量水準及劑量頻率可變化且

將取決於多種因素，包含所採用之特定化合物的活性；生物可用性、代謝穩定性、分泌速率以及所述混合物之作用時間長度；化合物之投與模式及投與時間；患者之年齡、體重、總體健康狀況、性別以及飲食；以及具體病狀之嚴重程度。

「治療」係指防治性治療或治療性治療或診斷性治療。在某些實施例中，「治療」係指出於治療、預防或診斷目的，向個體投與化合物或組合物。

「預防性」治療為出於降低產生病理學的風險的目的，向未展示疾病的病徵或僅展示疾病的早期病徵的個體投與治療。本發明之化合物或組合物可作為預防性治療提供以減少產生病理學的可能性或以使病理學（若產生）的嚴重程度最低。

「治療性」治療為出於減輕或消除病徵或症狀之目的，向展示所述病徵或症狀之個體投與治療。病徵或症狀可為生物化學、細胞、組織學、功能或物理、主觀或客觀的。本發明化合物亦可作為治療性治療給出或針對診斷給出。

「醫藥組合物」或「調配物」係指適於個體動物（包含人類及哺乳動物）中之醫藥用途的組合物。醫藥組合物包含治療有效量之CNP變異體肽、視情況選用之另一生物活性劑以及視情況選用之醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑。在一個實施例中，醫藥組合物涵蓋包括活性成分及構成載劑的惰性成分的組合物，以及直接或間接由任何兩種或更多種成分的組合、複合或聚集或由一或多種成分的解離或由一或多種成分的其他類型的反應或相互作用產生的任何產物。因此，本發明之醫藥組合物涵蓋藉由將本發明化合物與醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑摻和製得之

任何組合物。

「醫藥學上可接受之載劑」係指標準醫藥載劑、緩衝劑及其類似物中之任一者，諸如磷酸鹽緩衝鹽水溶液、5%右旋糖水溶液以及乳液（例如油/水或水/油乳液）。賦形劑之非限制性實例包括佐劑、黏合劑、填充劑、稀釋劑、崩解劑、乳化劑、濕潤劑、潤滑劑、助滑劑、甜味劑、調味劑以及著色劑。適合醫藥載劑、賦形劑以及稀釋劑描述於《雷明頓醫藥科學（Remington's Pharmaceutical Sciences）》，第19版（馬克出版公司，伊斯頓，1995）中。較佳醫藥載劑視投與活性劑的預期模式而定。投與之典型模式包含經腸（例如口服）或非經腸（例如皮下、肌肉內、靜脈內或腹膜內注射；或局部、經皮或經黏膜投與）。

「醫藥學上可接受之鹽」為可調配成用於醫藥用途之化合物的鹽，包含（但不限於）金屬鹽（例如鈉、鉀、鎂、鈣等）以及氨水或有機胺之鹽。

「醫藥學上可接受」或「藥理學上可接受」意謂不為生物學上或其他方面不合需要之物質，即可在不導致任何不合意生物影響情況下或在不以有害方式與含有其之組合物的任何組分或與存在於個體身體上或中之任何組分相互作用的情況下向個體投與之物質。

「生理學條件」係指動物（例如人類）體內之條件。生理學條件包含（但不限於）體溫以及具有生理學離子強度、pH及酶之水性環境。生理學條件亦涵蓋具體個體體內與大部分個體中存在的「正常」條件不同之條件，例如與約37°C之人類體溫不同或與約7.4的正常人類血液pH不同。

如本文所用，術語「個體」涵蓋哺乳動物及非哺乳動物。哺乳動物之實例包含（但不限於）哺乳動物類別之任何成員：人類、非人類靈長類

（諸如黑猩猩及其他猿類及猴類物種）；農畜，諸如牛、馬、綿羊、山羊、豬；家畜，諸如兔、犬及貓；實驗室動物，包含嚙齒動物，諸如大鼠、小鼠及天竺鼠以及其類似動物。非哺乳動物之實例包含（但不限於）鳥類、魚及其類似動物。術語並不指示特定年齡或性別。

除非另外規定，否則術語「聚乙二醇」、「PEG」、「聚氧化乙烯」以及「PEO」在本文中可互換使用。經胺基結合於締合數目為 n 之「PEOn」聚合物的CNP變異體一般具有化學式： $\text{CH}_3\text{-}[\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_n\text{-C(=O)-NHR}$ ，其中 n 為環氧乙烷單元數目且 R 表示其餘肽。「PEOn」聚合物在羰基碳與重複環氧乙烷單元之間可視情況具有伸烷基 $(\text{CH}_2)_m$ ，其中 m 為整數1至5。此類「PEOn」（例如PEO12或PEO24）聚合物為單分散的，即具有具體分子量之單個離散聚合物。類似地，經胺基結合於締合數目為 nK 之「PEGnK」聚合物的CNP變異體一般具有化學式 $\text{CH}_3\text{-}[\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_p\text{-C(=O)-NHR}$ ，其中 p 為大於1之整數。「PEGnK」聚合物亦可視情況在羰基碳與重複環氧乙烷單元之間具有伸烷基 $(\text{CH}_2)_m$ ，其中 m 為整數1至5。然而，此類「PEGnK」（例如PEG1K、PEG2K、PEG5K或PEG20K）聚合物為多分散的，即含有具有分子量分佈的聚合物的混合物，其中數目 nK 表示以千道爾頓為單位之聚合物數目平均分子量（ M_n ）。舉例而言，結合於CNP變異體之「PEG2K」表示聚合物數目平均分子量為約2 kDa的多分散PEG聚合物。

除非另外指示，否則當指出聚合物（例如PEG）之質量範圍（例如以kDa為單位）時，所述範圍係指聚合物數目平均分子量之範圍，而非多分散混合物中多種聚合物的分子量範圍。

B. CNP變異體肽

CNP-22作為治療劑之用途受其在血漿中之短半衰期限制（《臨床內分泌與代謝雜誌》，78: 1428-35 (1994)）。在人類血漿中，CNP-22之濃度通常低於5 pmol。在人類中，CNP-22藉由NEP及NPR-C降解及從循環清除（《生長激素及IGF研究（Growth Hormone & IGF Res.）》，16: S6-S14）。在使用全身性投與之CNP-22的全部人類及動物研究中，已使用連續輸注增加個體中之CNP-22濃度。具有較長半衰期及至少類似含量之官能度的CNP肽將有益於基於CNP之治療策略。具有改善特性之CNP變異體肽揭示於國際申請案第WO 2009/067639號及第WO 2010/135541號以及美國專利第8,198,242號、第8,598,121號以及第8,377,884號中，其全部以引用的方式特定併入本文中。

在某些實施例中，CNP變異體肽為CNP-37或CNP-38之衍生物。CNP-37變異體肽可在CNP-37的37個位置中的任何一或多個處含有胺基酸添加、缺失及/或經天然或非天然胺基酸或肽模擬物（例如肽鍵電子等排體）取代。CNP-37中可進行之取代的非限制性實例（基於CNP-22之編號）包含K4R、G5S、G5R、G8S、K10R、G15S、S16Q、M17N、G19R以及其組合。

在一個實施例中，CNP變異體肽為在furin裂解位點處具有突變/取代之經修飾CNP-37或CNP-38肽，其經設計以提高對furin蛋白酶之活體內抗性，及/或在N端處含有甘胺酸或脯胺酸-甘胺酸，其經設計以提高血漿穩定性及防止焦麩醯胺酸形成。例示性CNP-37變異體包含（但不限於）：

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSN SGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI G SMSG LGC (Met-

CNP-37；SEQ ID NO:2）；

PQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC （ Pro-CNP-37；SEQ ID NO:3）；

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37 (M32N)；SEQ ID NO:4]；

PGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（ Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5）；

MGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（ Met-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:6）；以及

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC （ Gly-CNP-37或CNP-38: SEQ ID NO:7）。

C. CNP變異體肽之合成及純化

在一些實施例中，適用於本文之CNP變異體肽藉由重組表現使用某些實施例中的此項技術中已知的特定技術製造。參看例如Sambrook, Fritsch及Maniatis, 《分子選殖：實驗室手冊》，第二版. 冷泉港實驗室出版社（ Cold Spring Harbor Laboratory Press ）（紐約冷泉港（ Cold Spring Harbor, N.Y.）（1989))；《DNA選殖：實踐方法（DNA Cloning: A Practical Approach）》，第I及II卷, D. N. Glover編（1985)；以及《分子生物學之當前方案（Current Protocols in Molecular Biology）》，約翰.威立父子公司（ John Wiley & Sons, Inc.）（1994）。

在某些實施例中，CNP變異體肽藉由重組方法製造，包括在導致表現聚核苷酸編碼之融合多肽表現的條件下在培養基中培養宿主細胞，所述宿主細胞包括編碼連接至第二聚核苷酸之CNP變異體肽的第一聚核苷酸，

所述第二聚核苷酸編碼可裂解肽或蛋白質，其中融合多肽包括直接連接於可裂解肽或蛋白質或經連接基團間接連接於可裂解肽或蛋白質的CNP變異體肽。在一些實施例中，宿主細胞用包括編碼CNP變異體肽之聚核苷酸的表現載體轉型，所述CNP變異體肽連接於編碼可裂解肽或蛋白質之聚核苷酸。在某些實施例中，融合多肽表現為可溶性蛋白質或包涵體。表現之融合多肽可自宿主細胞或培養基分離，且分離之融合多肽可與裂解劑接觸以釋放CNP變異體肽。

製造CNP變異體肽之方法描述於以引用的方式併入本文中的美國專利8,198,242、8,377,884及8,598,121中。

用於製造CNP變異體肽之宿主細胞可為細菌、酵母、昆蟲、非哺乳動物脊椎動物或哺乳動物細胞。細菌細胞包含但不限於大腸桿菌細胞株及菌株。大腸桿菌細胞株及菌株之非限制性實例包含BL21、BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS、BL21(DE3)pGro7、ArcticExpress(DE3)、C41 [亦稱為C41(DE3)]、C43 [亦稱為C43(DE3)]、Origami B(DE3)、Origami B(DE3)pLysS、KRX以及Tuner(DE3)。在一個實施例中，CNP變異體肽及CNP融合蛋白使用BL21(DE3)細胞製造。哺乳動物細胞包含（但不限於）倉鼠、猴、黑猩猩、犬、貓、牛、豬、小鼠、大鼠、兔、綿羊及人類細胞。宿主細胞可為永生化細胞（細胞株）或非永生化（一級或二級）細胞，且可為多種細胞類型中之任一種，諸如（但不限於）纖維母細胞、角質細胞、上皮細胞（例如乳房上皮細胞、腸道上皮細胞）、卵巢細胞（例如中國倉鼠卵巢或CHO細胞）、內皮細胞、膠細胞、形成血液成分之神經細胞（例如淋巴細胞、骨髓細胞）、軟骨細胞及其他骨骼源細胞，以及此等體細胞類型之前驅體。含有CNP變異體DNA或RNA之宿主細胞在適

於細胞生長、DNA或RNA表現以及表現CNP變異體肽之細胞的鑑別/選擇的條件下培養。

在某些實施例中，CNP變異體肽以包括CNP變異體肽及可裂解載體蛋白或可裂解標籤（例如肽標籤）之融合蛋白形式重組表現，其中融合蛋白包括直接連接於可裂解載體蛋白或標籤或經連接基團間接連接於可裂解載體蛋白或標籤之CNP變異體肽。載體蛋白或標籤之使用促進例如融合蛋白之偵測、分離及/或純化。可裂解載體蛋白及標籤包含（但不限於）組胺酸（例如六-His）標籤；人類轉錄因子TAF12（TAF12）、TAF12片段、TAF12組蛋白摺疊結構域、TAF12及其片段之突變體、TAF12(C/A)、TAF12(D/E)、TAF12(4D/4E)、TAF12(6D/6E)、TAF12(10D/10E)、TAF12(C/A及D/E)、TAF12(C/A及4D/4E)、TAF12(C/A及6D/6E)、TAF12(C/A及10D/10E)；酮類固醇異構酶（KSI）；麥芽糖-結合蛋白（MBP）； β -半乳糖（ β -Gal）；麩胱甘肽-S-轉移酶（GST）；硫氧還蛋白（Trx）；幾丁質結合域（CBD）；BMP-2、BMP-2突變體、BMP-2(C/A)；SUMO；以及其突變體及片段。

在其他實施例中，本文所述之CNP變異體肽使用肽合成器合成且根據此項技術中已知之方法，例如根據Atherton及Sheppard, 《固相肽合成：實踐方法（*Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*）》，IRL出版社（英國牛津（Oxford, England）（1989））之方法純化。

D. 使用CNP變異體肽、CNP變異體肽之醫藥組合物的方法以及投與途徑

使用CNP變異體之方法

骨骼相關病症/骨骼發育不良

纖維母細胞生長因子（FGF）在骨骼形成中起重要作用，且FGF受體基因（FGFR 1、2以及3）中之突變引起多種遺傳性骨骼畸形（《當代生物學（Curr. Biol.）》，5: 500-507 (1995)）。具體而言，FGFR-3中之活化突變造成長骨病症，包含軟骨發育不全，人類遺傳性侏儒症之最常見形式（《自然（Nature）》，371: 252-254 (1994)；《細胞（Cell）》，78: 335-342 (1994)）、輕微病症軟骨生成減退（《美國紐約科學院年刊（Ann. N.Y. Acad. Sci.）》，785: 182-187 (1996)）以及較嚴重且新生兒致死性骨發育不良（TD）（I型及II型）（《人類分子遺傳學（Hum. Mol. Genet.）》，5: 509-512 (1996)；《自然遺傳學（Nat. Genet.）》，9: 321-328 (1995)）。過度表現FGF-2且必然地活化FGFR-3之小鼠模型顯示縮短的長骨及大頭畸形（《分子生物細胞（Mol. Biol. Cell）》，6: 1861-73 (1995)）。與此模型相符，缺乏FGFR-3之小鼠顯示顯著骨骼過度生長且生長板較寬（《自然遺傳學》，12: 390-397 (1996)）。

藉由刺激軟骨細胞之基質產生、增殖及分化以及增加長骨生長，本發明之CNP變異體肽適用於治療罹患骨骼相關病症（諸如骨骼發育不良）之哺乳動物，包含人類。CNP反應性骨骼相關病症及骨骼發育不良之非限制性實例包含軟骨發育不全、軟骨生成減退、身材矮小、侏儒症、骨軟骨發育不良、致死性骨發育不良、成骨不全、軟骨成長不全、先天性成骨不全、純合軟骨發育不全、先天性成骨不全、屈肢骨發育不良、先天性致死型低磷酸酯酶症、圍產期致死型成骨不全、短肋多指畸形症候群、軟骨生成減退、肢根型點狀軟骨發育不良、揚森型幹骺端發育不良（Jansen-type metaphyseal dysplasia）、先天性脊椎骨骺發育不良、骨發育不全

症、扭曲性骨發育不良、先天性股骨短、蘭格型肢中骨發育不良（Langer-type mesomelic dysplasia）、尼維格型肢中骨發育不良（Nievergelt-type mesomelic dysplasia）、羅比撓症候群（Robinow syndrome）、萊因哈特症候群（Reinhardt syndrome）、肢端發育不全、周圍骨發育障礙、凱乃斯特發育不良（Kniest dysplasia）、纖維軟骨生成、羅伯茨症候群（Roberts syndrome）、肢端肢中發育不全、小肢畸形、莫基奧症候群（Morquio syndrome）、凱乃斯特症候群、幹骺端骨發育不良以及脊椎幹骺端發育不良。另外，CNP變異體適用作用於治療特發性身材矮小及其他骨骼發育不良之生長激素的輔助或替代。

另外，CNP變異體肽適用於治療其他骨骼相關病狀及病症，諸如佝僂病、低磷酸鹽血性佝僂病[包含X連接低磷酸鹽血性佝僂病（亦稱為維生素D耐藥性佝僂病）及常染色體顯性低磷酸鹽血性佝僂病]，及骨質軟化[包含腫瘤誘導之骨質軟化（亦稱為致癌骨質軟化或致癌低磷酸鹽血性骨質軟化）]。

在某些實施例中，本發明之CNP變異體肽及包括其之組合物及調配物適用於改善骨骼發育不良之一或多種症狀或生理學後果，其中改善可為絕對生長增加、生長速度增加、定性運算層析成像（QCT）骨礦物質密度增加、生長板形態改善、長骨生長增加、脊柱形態改善、肘關節運動範圍改善及/或睡眠呼吸暫停減少。就此而言，應注意術語「改良」、「增加」、「降低」及其語法等效物當相對於疾病狀態之症狀或生理學後果使用時均為相對術語，係指用本發明之CNP變異體肽（或包括其之組合物或調配物）治療後疾病的症狀或生理學後果相較於用本發明之CNP變異體肽（或包括其之組合物或調配物）治療之前的疾病的相同症狀或生理學後果

（即相較於「基線」）的狀態。如上文所述，「基線」狀態可藉由治療之前個體狀態之量測（其可隨後與治療後同一個體之狀態）或藉由罹患相同病痛且共用相同或類似特徵（例如年齡、性別及/或疾病狀態或進展）之個體群體的狀態之量測測定。

增加或提高生長速度

本發明之組合物及調配物亦可出於提高或增加罹患骨骼發育不良之個體的生長速度的目的而投與。在一個較佳實施例中，個體患有軟骨發育不全。

個體中生長速度之量測可隨時間使用此項技術中熟知的標準技術進行。在某些實施例中，可經指定時段進行諸如站立高度、坐高、體重、頭圍、上臂長度、下臂（前臂）長度、大腿長度、小腿長度（膝蓋至腳部）、手長（手腕至手指末端）及/或腳長之參數的量測來測定特定生長速率，如藉由任何具體參數（即生長速度）所量測。指定時間段之生長速度的量測可「按年計算」，其中經特定時段計算之生長速率轉化成一年時段的預期生長速率。用本發明之**CNP**變異體肽治療之前的個體中生長速度之量測（即「基線」生長速度）可與用本發明之**CNP**變異體肽治療期間或之後的生長速度量測比較，測定治療對個體中生長速度之改變的作用。

「基線」生長速度亦可自與使用本發明之**CNP**變異體肽治療的個體具有相同通用年齡、性別及疾病狀態之個體群體測定。

可定量量測如用本發明之**CNP**變異體肽（或包括其之組合物或調配物）治療有需要之個體誘發或引起的一或多個上文所述之參數（例如站立高度等）之評定量測的生長速度之改良。就此而言，在某些實施例中，用本發明的**CNP**變異體（或包括其之組合物或調配物）治療的個體中任何具

體參數的生長速度的按年計算之增加或改良高於基線至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%或更高。在某些實施例中，本文所述之方法導致如站立高度所量測之生長速度按年計算之增加高於基線至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%或更高。在其他實施例中，本文所述之方法導致如坐高、體重、頭圍、上臂長度、下臂（前臂）長度、大腿長度、小腿長度（膝蓋至腳部）、手長（手腕至手指末端）或腳長所量測的生長速度的按年計算之增加高於基線至少約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%或更高。如本文所述，基線比較器可為用本發明的CNP變異體肽治療同一個體之前的特定參數所量測的按年計算之生長速度，或可為自與用本發明的CNP變異體肽治療之個體具有相同通用年齡、性別及疾病狀態之個體群體所測定的生長速度。

與特定身體區段與其他區段之比例有關的人體量測資料亦可獲自用CNP變異體肽治療之前及之後的個體，以測定投與CNP變異體肽是否導致此類比例的改變。舉例而言，上半身長度（腰部至頭頂）比下半身長度（腰部至腳部）的比率可在用CNP變異體肽治療之前（即基線）及用CNP變異體肽治療之後計算以測定用CNP變異體肽治療是否對身體比例具有不良影響。亦可計算及比較上臂比前臂長度的比率或大腿比小腿（膝蓋至腳部）的比率以測定CNP變異體肽治療對身體比例之影響。在本發明的一個較佳實施例中，向個體投與CNP變異體肽不會導致如任何特定比率與基線相比所量測的身體比例顯著改變。就此而言，在某些實施例中，用本發明之CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物治療導致任一上文所述比率的改變不超過0.5、0.25、0.20、0.15、0.10或0.05，較佳不超過0.05。

在本文所述之多種方法中，CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物的投與較佳不導致所治療個體中2級或更高級別，或3級或更高級別的與研究藥物有關的不良事件。就此而言，用於量測及評級與使用化合物治療個體有關的生理學事件的技術以及分級不良事件的列表可見於http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf，其以引用的方式併入本文中。

此外，在本文所述的多種方法中，投與CNP變異體肽或包括其之組合物或調配物較佳不導致以下一或多個生理學參數臨床顯著改變（相較於基線增加或降低）；血液中血紅蛋白濃度、血液中血小板數目、血液電解質濃度、血液脲氮濃度、血液肌酐濃度、血液鹼性磷酸酶濃度、血液丙胺酸轉胺酶濃度或血液天冬胺酸轉胺酶濃度。藉由「臨床顯著改變」意謂觀測到導致個體之整體健康狀況發生可偵測/可觀測不良生理學改變的上述參數中任何一或多個的改變。

CNP變異體肽的醫藥組合物及調配物

在額外實施例中，本發明涵蓋包括CNP變異體肽以及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、載劑及/或稀釋劑的醫藥組合物及調配物的用途。在某些實施例中，組合物進一步包括一或多種其他生物活性劑（例如蛋白酶抑制劑、受體酪胺酸激酶及/或清除受體NPR-C）。

賦形劑、載劑及稀釋劑的非限制性實例包含媒劑、液體、緩衝劑、等張劑、添加劑、穩定劑、防腐劑、增溶劑、界面活性劑、乳化劑、濕潤劑、佐劑等。組合物可含有液體（例如水、乙醇）；多種緩衝劑內容物（例如Tris-HCl、磷酸鹽、乙酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑）之稀釋劑、pH及離子強度；清潔劑及增溶劑（例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯

80)；抗氧化劑（例如甲硫胺酸、抗壞血酸、偏亞硫酸氫鈉）；防腐劑（例如Thimerosal、苯甲醇、間甲酚）；以及膨化物質（例如乳糖、甘露糖醇、蔗糖）。賦形劑、稀釋劑及載劑於醫藥組合物之配方中的用途為此項技術中已知：參看例如《雷明頓醫藥科學》，第18版，第1435頁-第1712頁，馬克出版公司（賓夕法尼亞州伊斯頓（1990）），其以全文引用的方式併入本文中。

舉例而言，載劑包含但不限於稀釋劑、媒劑及助劑，以及植入載劑，以及惰性無毒固體或液體填充劑，以及不與活性成分反應之囊封材料。載劑之非限制性實例包含磷酸鹽緩衝鹽水、生理鹽水、水以及乳液（例如油/水乳液）。載劑可為含有例如乙醇、多元醇（例如丙三醇、丙二醇、液體聚乙二醇及其類似物）、植物油以及其混合物的溶劑或分散介質。

在一些實施例中組合物為液體調配物。在某些實施例中，調配物包括之CNP變異體肽的濃度在約0.1 mg/ml至約20 mg/ml，或約0.5 mg/ml至約20 mg/ml，或約1 mg/ml至約20 mg/ml，或約0.1 mg/ml至約10 mg/ml，或約0.5 mg/ml至約10 mg/ml，或約1 mg/ml至約10 mg/ml，或約2 mg/ml至約10 mg/ml範圍內，或約2 mg/ml或約10 mg/ml。在其它實施例中，調配物可為凍乾調配物或可為事先自凍乾調配物復原之液體調配物。

在其他實施例中，組合物包括緩衝溶液或緩衝劑來保持含有CNP之溶液或懸浮液的pH在所要範圍內。緩衝溶液的非限制性實例包含磷酸鹽緩衝鹽水、Tris緩衝鹽水以及漢克緩衝鹽水（Hank's buffered saline）。緩衝劑包含但不限於乙酸鈉、磷酸鈉、單水合檸檬酸以及二水合檸檬酸

鈉。亦可使用緩衝劑之混合物。在某些實施例中，緩衝劑為乙酸/乙酸鹽或檸檬酸/檸檬酸鹽。組合物中適合的緩衝劑之量部分取決於所用之具體緩衝劑以及溶液或懸浮液之所要pH。舉例而言，乙酸鹽在pH 5下為比pH 6下更高效之pH緩衝劑，因此pH 5時溶液中使用之乙酸鹽可少於pH 6時。在一些實施例中，緩衝劑之濃度為約10 mM $\pm$ 5 mM。在某些實施例中，組合物之pH為約pH 3至約pH 7.5，或約pH 3.5至約pH 7，或約pH 3.5至約pH 6.5，或約pH 4至約pH 6，或約pH 4至約pH 5，或為約pH 5.0 $\pm$ 1.0，或為約pH 5.5 $\pm$ 1.0。

在其他實施例中，組合物含有等張劑賦予溶液或懸浮液等張性且與注射更相容。等張劑之非限制性實例包含NaCl、海藻糖、甘露糖醇、右旋糖、葡萄糖、丙三醇、山梨糖醇、木糖醇以及乙醇。在某些實施例中，等張劑為海藻糖或甘露糖醇，其可個別地或組合採用。在某些實施例中，海藻糖或甘露糖醇濃度為約160 $\pm$ 20 mM，或約140 mM $\pm$ 20 mM，或約120 $\pm$ 20 mM，或約100 mM $\pm$ 20 mM，或約80 mM $\pm$ 20 mM，或約60 mM $\pm$ 20 mM。

在多個實施例中，組合物可包括防腐劑。防腐劑包含（但不限於）間甲酚及苯甲醇。在某些實施例中，防腐劑濃度為約0.4% $\pm$ 0.2%，或約1% $\pm$ 0.5%，或約1.5% $\pm$ 0.5%，或約2.0% $\pm$ 0.5%。在本發明之某些實施例中，組合物或調配物不含防腐劑。

在多個實施例中，組合物含有抗吸附劑（例如降低CNP變異體至玻璃或塑膠之吸附）。抗吸附劑包含但不限於苯甲醇、聚山梨醇酯20以及聚山梨醇酯80。在某些實施例中，抗吸附劑濃度為約0.001%至約0.5%，或約0.01%至約0.5%，或約0.1%至約1%，或約0.5%至約1%，或約0.5%至

約1.5%，或約0.5%至約2%，或約1%至約2%。

在多個實施例中，組合物包括穩定劑。穩定劑之非限制性實例包含甘油、丙三醇、硫代甘油、甲硫胺酸以及抗壞血酸及其鹽。在一些實施例中，當穩定劑為硫代甘油或抗壞血酸或其鹽時，穩定劑濃度為約0.1%至約1%。

在多個實施例中，組合物含有抗氧化劑。例示性抗氧化劑不限於抗壞血酸。在某些實施例中，抗氧化劑比CNP變異體肽之莫耳比為約0.1:1至約15:1，或約1:1至約15:1，或約0.5:1至約10:1，或約1:1至約10:1或約3:1至約10:1。

組合物中可使用醫藥學上可接受之鹽，包含（但不限於）無機酸鹽（例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽）、有機酸鹽（例如乙酸鹽、丙酸鹽、丙二酸根、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、甲苯磺酸鹽），以及胺之鹽（例如異丙胺、三甲胺、二環己胺、二乙醇胺）。醫藥學上可接受之鹽的詳盡論述見於《雷明頓醫藥科學》，第18版，馬克出版公司，（賓夕法尼亞州伊斯頓（1990））。

用於非經腸投與之調配物可以製備為例如液體溶液或懸浮液形式、適於在注射之前溶解或懸浮於液體介質中的固體形式或乳液形式。舉例而言，無菌可注射溶液及懸浮液可根據此項技術中已知的技術使用適合稀釋劑、載劑、溶劑（例如緩衝水溶液、林格氏溶液（**Ringer's solution**）、等張氯化鈉溶液）、分散劑、濕潤劑、乳化劑、懸浮劑及其類似物調配。另外，可使用無菌固定油、脂肪酯、多元醇及/或其他非活性成分。作為其他實例，用於非經腸投與之調配物包含可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及使調配物與預期接受者血液等張之溶質的水性無菌注射溶液；以及可

含有懸浮劑及增稠劑之水性及非水性無菌懸浮液。

例示性含有CNP肽之調配物描述於美國專利8,198,242及8,598,121中。預期使用pH在約4至約6範圍內的CNP調配物。

在多個實施例中，CNP變異體肽可在醫藥載劑中調配從而向受骨骼發育不良影響的個體投與。在一些實施例中，CNP變異體肽之液體調配物根據成分之任何組合調配且其量或濃度在下文中描述：

成分類別	成分	濃度範圍
活性成分	CNP變異體肽	10 mg/mL ± 9.9 mg/mL
緩衝劑	乙酸/乙酸鹽	10 mM ± 5 mM，或pH 5 ± 1
緩衝劑	檸檬酸/檸檬酸鹽	10 mM ± 5 mM，或pH 5 ± 1
等張性調節劑	NaCl	140 mM ± 20 mM
等張性調節劑	海藻糖；甘露糖醇	10% ± 5%
防腐劑	間甲酚	0.4% ± 0.1%或0.2%
防腐劑/抗吸附劑	苯甲醇	1.5% ± 0.5%
穩定劑	甘油（丙三醇）	5% - 100%（純淨）
穩定劑	甲硫胺酸	0.01% - 0.2%
穩定劑	抗壞血酸/抗壞血酸鹽	0.1% - 1%
穩定劑	硫代甘油	0.1% - 1%
抗吸附劑	聚山梨醇酯20	0.001% - 0.5%
	聚山梨醇酯80	0.001% - 0.5%
	苯甲醇	0.5% - 1.5%

包括CNP變異體肽之組合物亦可為凍乾調配物。在某些實施例中，凍乾調配物包括緩衝劑及膨化劑，以及視情況存在之抗氧化劑。例示性緩衝劑包含但不限於乙酸鹽緩衝劑及檸檬酸鹽緩衝劑。例示性膨化劑包含但不限於甘露糖醇、蔗糖、聚葡萄糖、海藻糖及聚維酮（PVP K24）。在某些實施例中，甘露糖醇及/或海藻糖之量為約3%至約10%，或約4%至約8%，或約4%至約6%。在某些實施例中，蔗糖之量為約6%至約20%，或約6%至約15%，或約8%至約12%。

在多個實施例中，CNP變異體肽之凍乾調配物自根據任何成分組合調配之調配物製備且所述成分之量或濃度在下文中描述：

成分類別	成分	濃度範圍
活性成分	CNP變異體	10 mg/mL ± 9.9 mg/mL
緩衝劑	乙酸/乙酸鹽	10 mM ± 5 mM，或pH 5 ± 1
緩衝劑	檸檬酸/檸檬酸鹽	10 mM ± 5 mM，或pH 5 ± 1
等張性調節劑/膨化劑	山梨糖醇	5% ± 3%
等張性調節劑/膨化劑	甘露糖醇/海藻糖	5% ± 3%
等張性調節劑/膨化劑	蔗糖	10% ± 5%
防腐劑	間甲酚	0.4% ± 0.2%
防腐劑/抗吸附劑	苯甲醇	1.5% ± 0.5%
穩定劑	甘油（丙三醇）	5% - 100%（純淨）
穩定劑	甲硫胺酸	0.01% - 0.2%
穩定劑	抗壞血酸/抗壞血酸鹽	0.1% - 1%
穩定劑	硫代甘油	0.1% - 1%
抗吸附劑	聚山梨醇酯20	0.001% - 0.5%
	聚山梨醇酯80	0.001% - 0.5%
	苯甲醇	0.5% - 1.5%

在多個實施例中，包括CNP變異體肽之調配物的pH為約3-7，或約3-6，或約3.5-6.5，或約4-6，或約4-5，或約4.5-5.5。在一些實施例中，對於pH 4-5.5，適合緩衝劑為乙酸/乙酸鹽（例如乙酸钠），且對於pH 5.5-6，適合緩衝劑為檸檬酸/檸檬酸鹽。檸檬酸/檸檬酸鹽（例如檸檬酸钠）亦為pH 3-6或pH 4-6範圍內的適合緩衝劑。在某些實施例中，緩衝劑於調配物中的濃度為約2-50 mM，或約2-40 mM，或約2-30 mM，或約5-30 mM，或約2-20 mM，或約5-20 mM，或約5-15 mM。

亦為了使CNP變異體肽之脫醯胺降至最低或避免CNP變異體肽之脫醯胺，可藉由凍乾自調配物移除水。在一些實施例中，凍乾調配物含有具有以下組分之任何組合：緩衝劑：乙酸钠及乙酸，或檸檬酸钠及檸檬酸；

等張劑/膨化劑：甘露糖醇（例如3-10%、2-8%或4-6%）；蔗糖（例如6-20%、5-15%或8-12%）；抗氧化劑：各抗氧化劑比CNP變異體肽之莫耳比為約0.1:1至約1:1，或約0.5:1至約5:1，或約1:1至約15:1，或約1:1至約10:1，或約3:1至約10:1的甲硫胺酸及/或抗壞血酸。

亦可藉由在諸如約5℃、0℃、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃或-100℃之低溫下儲存CNP組合物（例如液體調配物或凍乾調配物）使脫醯胺降至最低或避免脫醯胺。

為了使CNP變異體肽中之可氧化殘基（例如甲硫胺酸）降至最低或避免其氧化，變異體可用一或多種抗氧化劑調配。例示性抗氧化劑包含（但不限於）甲硫胺酸、抗壞血酸及硫代甘油。亦可藉由用氮氣或氬氣自液體介質（若液體調配物）淨化氧氣，及/或藉由用氮氣或氬氣自容器或封裝淨化氧氣使例如甲硫胺酸殘基之氧化降至最低或避免例如甲硫胺酸殘基之氧化。

在一些實施例中，為了使吸附（例如CNP變異體肽吸附至塑膠或玻璃）降至最低或防止吸附，向CNP調配物中添加聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80或苯甲醇，或其組合。在某些實施例中，各抗吸附劑之濃度為約0.001%至約0.5%，或約0.01%至約0.5%，或約0.1%至約1%，或約0.5%至約1%，或約0.5%至約1.5%，或約0.5%至約2%，或約1%至約2%。抗吸附劑於調配物中之例示性範圍包含但不限於約0.001%至約0.5%聚山梨醇酯20、約0.001%至約0.5%聚山梨醇酯80及/或約0.5%至約1.5%苯甲醇。

本發明亦提供套組，其含有例如瓶子、小瓶、安瓿、試管、套筒及/或注射器，其包括液體（例如無菌可注射）調配物或固體（例如凍乾）調

配物。套組亦可含有醫藥學上可接受之媒劑或載劑（例如溶劑、溶液及/或緩衝液），其用於將固體（例如凍乾）調配物復原為溶液或懸浮液以用於投與（例如藉由注射），包含（但不限於）復原注射器中的凍乾調配物以用於注射或將濃縮物稀釋至較低濃度。此外，即用型注射溶液及懸浮液可自例如包括含有CNP之組合物的無菌粉末、顆粒或錠劑製備。套組亦可包含散佈裝置（諸如噴霧或注射散佈裝置）、筆式噴射器、自動噴射器、無針噴射器、注射器及/或針。

劑量及給藥頻率

如本文所用，術語活性劑（例如CNP變異體肽）的「治療有效量」係指向患者提供治療益處的量。各個體的量可不同且可取決於許多因素，包含患者之整體身體狀況。熟習此項技術者使用公眾可獲得之材料及程序容易確定CNP變異體肽之治療有效量。舉例而言，療法所用之CNP變異體肽之量應產生基於0-17歲年齡的患有軟骨發育不全兒童（214名女性及189名男性）的生長曲線表的可接受之生長速率，所述生長曲線表列出針對年齡之身高、頭圍及區段生長（Horton WA等人，軟骨發育不全之標準生長曲線（Standard growth curves for achondroplasia），《世界兒科雜誌（J. Pediatr.）》，93: 435-8 (1978)）。CDC圖表可用於評定針對年齡之體重、以及針對身高之體重或針對年齡之BMI。亦可量測更長期週期的輔助結果。

具體個體之給藥頻率可視多種因素而變化，包含所治療病症及病狀及個體對療法之反應。在某些實施例中，約每天一次、每兩天一次、每三天一次或每週一次、每週兩次、每週三次、每兩週一次或每月一次向個體投與含有CNP變異體肽之醫藥組合物。在一個實施例中，對於治療骨

骼相關病症（例如骨骼發育不良，包含軟骨發育不全），向患者投與每日或每週劑量之CNP變異體肽直至成人期及/或貫穿成人期。

在某些實施例中，以約5或10 nmol/kg至約300 nmol/kg，或約20 nmol/kg至約200 nmol/kg範圍內之劑量投與本文所述之CNP變異體肽。在一些實施例中，CNP變異體肽以約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或2000 nmol/kg之劑量或治療醫師認為適當的其他劑量投與。在其他實施例中，CNP變異體肽以約5、7.5、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或1000 µg/kg，或約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或10 mg/kg之劑量或治療醫師認為適當的其他劑量投與。在多個實施例中，CNP變異體肽以約7.5至100 µg/kg，或約15至75 µg/kg，或約15至30 µg/kg，或約2.5 µg/kg、7.5 µg/kg、15.0 µg/kg、30.0 µg/kg或60.0 µg/kg之劑量投與。本文所述之CNP變異體肽的劑量可根據本文所述之給藥頻率/投與頻率投與，包含（但不限於）每日一次、每週2次或3次、每週一次、每2週一次、每3週一次、每月一次等。CNP變異體肽之投與可經長時間進行，在一些情況下，經一個月、三個月、六個月或更久。

針對具體個體之給藥頻率/CNP變異體肽投與可視多種因素而變化，包含所治療病症及病狀及個體對療法之反應。CNP變異體肽可以每次給藥

單次劑量或多次劑量投與。在某些實施例中，CNP變異體肽以單次劑量或多次劑量每日一次、每隔一天一次、每3天一次、每週2次、每週3次、每週一次、每兩週一次、每3週一次、每月一次、每6週一次、每2個月一次、每3個月一次或如治療醫師認為適當投與。

在一些實施例中，投與CNP變異體肽從而允許生長週期（例如軟骨生成），繼之以恢復時段（例如成骨）。舉例而言，CNP變異體肽可靜脈內、皮下、關節內或藉由另一模式每日一次或每週多次投與一段時間，繼之以無處理之時段，接著重複所述循環。在一些實施例中，初始治療時段（例如每日投與或每週多次投與CNP變異體肽）持續3天、1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週或12週。在一個相關實施例中，無治療時段持續3天、1週、2週、3週或4週。在某些實施例中，CNP變異體肽之給藥方案為每日投與持續3天，繼之以3天停藥；或每日投與或每週多次投與持續1週，繼之以3天或1週停藥；或每日投與或每週多次投與持續2週，繼之以1週或2週停藥；或每日投與或每週多次投與持續3週，繼之以1週、2週或3週停藥；或每日投與或每週多次投與持續4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週或12週，繼之以1週、2週、3週或4週停藥。

投與模式

CNP變異體肽或包括其之醫藥組合物或調配物可以多種方式向個體投與，諸如藉由皮下、關節內、靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮內或鞘內注射。在一個實施例中，CNP變異體肽藉由每天一次、每隔一天一次、每三天一次或一週一次單次皮下、關節內、靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮內或鞘內注射投與。

CNP變異體肽亦可藉由在疾病部位處或附近直接注射投與。另外，CNP變異體肽可藉由在目標作用部位處（例如異常或退化關節或軟骨區域）植入儲槽來投與。或者，CNP變異體肽可在舌頭下部舌下投與（例如舌下錠劑）或藉由吸入至肺部（例如吸入劑或氣霧劑噴霧）、藉由傳遞至鼻腔（例如鼻內噴霧）、藉由傳遞至眼睛（例如滴眼劑）或藉由經皮傳遞（例如藉助於皮膚上之貼片）。CNP變異體肽可以微球體、微膠囊、脂質體（不帶電或帶點（例如陽離子））、聚合微粒（例如聚醯胺、聚乳酸交酯、聚乙交酯、聚(丙交酯-乙交酯)）、微乳液及其類似物形式經口投與。

另一投與方法為藉由滲透泵（例如Alzet泵）或微泵（例如Alzet微滲透泵），其允許經預定時段控制、連續及/或緩慢釋放傳遞CNP變異體肽或醫藥組合物。滲透泵或微泵可皮下植入，或在目標部位（例如肢體長骨、松果體等）附近。

熟習此項技術者顯而易知，CNP變異體肽或其組合物亦可藉由其他模式投與。CNP變異體肽或其組合物之最有效投與模式的測定在熟習此項技術者技能範圍內。

本發明之額外態樣及細節自以下實例將顯而易知，所述實例打算為說明性而非限制性的。

E. 實例

實例1-軟骨發育不全患者之六個月人類臨床試驗資料

為了測定CNP變異體肽對軟骨發育不全患者中骨骼發育不良（例如軟骨發育不全）之症狀及長骨生長及/或生長速度的作用（如藉由治療後患者站立高度的增加速率與治療前比較所量測），在如臨床證據所記錄且

由遺傳學測試所確認記載ACH的5-14歲（包含端點）軟骨發育不全（ACH）兒童中進行劑量遞增研究。

在投與如本文所述的包括CNP變異體肽之調配物之前，以三個月間隔自未經治療的研究患者收集連續生長量測（對多個不同參數）及生長速度分級量測（在至少患者站立高度中）以如上文所述確定生長速度之基線水準及身體比率。獲得生長速度及身體比例之基線水準後，包括CNP變異體肽（具體言之Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5）之調配物接著以每日劑量形式使用以下每日給藥方案中的一種皮下投與：第1組（n=8）：2.5 µg/kg Pro-Gly-CNP-37肽的每日劑量，第2組（n=8），7.5 µg/kg Pro-Gly-CNP-37肽的每日劑量；第3組（n=10），15.0 µg/kg Pro-Gly-CNP-37肽的每日劑量。進行每日皮下投與持續6個月。

更具體言之，Pro-Gly-CNP-37肽調配成不含防腐劑之無菌組合物，其包括2.0 mg/ml或10 mg/ml CNP肽與0.28 mg/ml單水合檸檬酸、1.08 mg/ml二水合檸檬酸鈉、58.01 mg/ml二水合海藻糖、15 mg/ml D-甘露糖醇、0.73 mg/ml L-甲硫胺酸以及0.05 mg/ml聚山梨醇酯80，pH 5.5之組合。此液體組合物自包括所述組分之初始凍乾調配物復原且在無菌單次使用I型未經處理之硼矽酸鹽透明玻璃小瓶中供應。此復原液體調配物用於本文所述的全部人類臨床治療研究中。

在投與CNP變異體肽之過程期間，採用多種評定，包含體重、骨骼長度及骨骼生長之量測、包含計算上臂長度比前臂長度之比率、大腿長度比小腿長度之比率以及上半身長度比下半身長度之比率。亦藉由量測患者之站立高度來量測生長速度，且將資料與事先獲得之基線生長速率比較。初次投與CNP變異體肽之後約第15天、第22天、第29天、第43天、第85

天、第127天及第183天進行評定。

探索性成像評定資料包含脊柱、長骨及肢端之量測及形態，以及生長板、骨骼年齡及骨礦物質密度的量測。分析法包含用於基線釐評定的骨盆之前後軸（AP）x射線；評定骨骼年齡（Greulich, 1971, 史丹福大學出版社（Stanford University Press.））；（Tanner, 1975, 學術出版社（Academic Press.））、生長板、手長度及皮層厚度的左手及手腕後前軸（PA）放射照片；評定生長板、脛骨長度、皮層厚度及肘部之AP下肢放射照片；評定橫向椎弓根間距之腰部脊柱的AP放射照片。進行腰部脊柱之橫向放射照片來評定胸腰椎脊柱前彎症角度、脊椎形態以及與脊柱狹窄有關的其他可能性改變、評定骨礦物質密度、生長板形態及骨骼長度的前臂及脛骨之QCT掃描。此掃描可使用標準CT掃描儀、校準模體以及指定軟體使用避免直接輻射頭部及軀幹的預定低輻射劑量方案獲得。

睡眠研究：兒童之未經治療的睡眠呼吸暫停已反覆地與官能性和健康結果差關聯，包含對兒童發育之特定態樣（諸如行為及學習）的負面影響。報導與兒童睡眠呼吸暫停有關的認知不足包含學習、記憶以及視覺-空間技能；語言、言語流暢、學校表現以及執行功能。另外，兒童睡眠呼吸障礙已與生長異常；心臟健康狀況改變，包含收縮壓及舒張壓、自主調節、腦部充氧以及大腦血液流量關聯，表明兒童阻塞性睡眠呼吸暫停症候群可危及長期心血管健康；以及全身發炎標記（Marcus, 2012, 《兒科（Pediatrics）》）。使用睡眠測試裝置藉由量測隔夜監測期間之血液氧飽和度、脈搏率及氣流來評定睡眠呼吸障礙之存在及嚴重程度。睡眠呼吸暫停之評定包含（但不限於）判斷每小時呼吸暫停及呼吸不足發作次數（呼吸暫停/呼吸不足指數，AHI）。

使用測角計量測肘關節運動範圍之屈曲-伸展量測值。

生物標記物藉由相對於基線之改變評估且包含（但不限於）軟骨轉換（CTX-II）、軟骨細胞及成骨細胞活性（骨骼特異性鹼性磷酸酶）、骨骼形成（PINP）、骨骼轉換（骨鈣化素）；以及CNP生物活性（cGMP、NT-proCNP以及ANP）之標記物以及額外生物標記物之評定。在指定時間點收集膠原蛋白及骨骼轉換的血液及尿液生物化學標記物以及CNP活性之標記物的樣品。

結果：藉由量測治療期間的站立高度改變且與治療之前量測的基線生長速率比較，在第1組（2.5 µg/kg/天）、第2組（7.5 µg/kg/天）以及第3組（15 µg/kg/天）量測總共26名患者用CNP變異體肽Pro-Gly-CNP-37治療引起的生長速度改變。站立高度生長速度經6個月研究的平均改變概括於表1中。如表1中所證實，用2.5 µg/kg/天Pro-Gly-CNP-37治療6個月（第1組）的軟骨發育不全患者中觀測到生長速度未顯著增加。然而，與第1組之患者相比，用7.5 µg/kg/天Pro-Gly-CNP-37治療6個月（第2組）的軟骨發育不全患者證實站立高度生長速度統計顯著增加（p值=0.04）（與其事先計算的基線站立高度生長速率相比）。更具體言之，第2組之患者顯示站立高度生長速度1.3 cm/年的平均增加，此展現按年計算之生長速度高於基線45%的增加。最終，用15 µg/kg/天Pro-Gly-CNP-37治療6個月（第3組）的軟骨發育不全患者亦證實站立高度生長速度統計顯著增加（p值=0.01）（與其事先計算的基線站立高度生長速率相比）。更具體言之，第3組之患者顯示站立高度生長速度2.0 cm/年的平均增加，此展現按年計算之生長速度高於基線50%的增加。此等資料表明軟骨發育不全患者用至少7.5 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療持續

6個月或更久之時段，對骨骼生長、生長速度及軟骨發育不全的一般治療症狀具有有益作用。

表1

功效分析：按年計算之6個月生長速度			
生長速度	第1組 每日2.5 µg/kg (n=8*)	第2組 每日7.5 µg/kg (n=8)	第3組 每日15 µg/kg (n=10)
基線 平均值 (cm/年)	3.8	2.9	4.0
治療後 平均值 (cm/年)	3.4	4.2	6.1
相對於基線之改變 平均值 (cm/年)	-0.4	1.3	2.0
95%信賴區間 (cm/年)	-1.8, 1.1	0.1, 2.5	0.6, 3.4
p值**	0.56	0.04	0.01
相對於基線增加之百分比 基於平均值 (%)	NM	45	50

身體比例.在治療之前（基線）及用CNP變異體肽治療過程期間，針對全部組中之全部患者計算身體比率（上半身長度比下半身長度、上臂長度比前臂長度以及大腿長度比小腿[膝蓋至腳部]長度）。

對於第1組，平均基線上半身長度比下半身長度比率、平均基線上臂長度比前臂長度比率以及平均基線大腿長度比小腿長度比率分別為2.09、1.13及0.67。用2.5 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療6個月之後，測得同一身體比率分別為2.07、1.11及0.67，表明彼等同一身體比率的平均改變分別為-0.02、-0.02及0.0。

對於第2組，平均基線上半身長度比下半身長度比率、平均基線上臂長度比前臂長度比率以及平均基線大腿長度比小腿長度比率分別為2.03、

1.14及0.66。用7.5 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療6個月之後，測得同一身體比率分別為2.03、1.14及0.66，表明彼等同一身體比率的平均改變分別為0.0、0.0及0.0。

對於第3組，平均基線上半身長度比下半身長度比率、平均基線上臂長度比前臂長度比率以及平均基線大腿長度比小腿長度比率分別為1.91、1.13及0.69。用15 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療6個月之後，測得同一身體比率分別為1.89、1.08及0.69，表明彼等同一身體比率的平均改變分別為-0.02、-0.05及0.0。

此等資料表明在用CNP變異體肽治療6個月之後，因為全部所測量身體比率相對於基線之改變降至-0.05與0.05之間，用CNP變異體肽治療軟骨發育不全患者對整體身體比例不具有顯著不良影響。

不良事件.每一個上述組中之全部患者針對不良事件（具體由CNP變異體肽治療引起）之存在進行定期評定（如http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf所定義）。三個研究組中任一組中均無患者顯示2級或更高級別的確定與研究藥物有關的不良事件，表明用CNP變異體肽治療軟骨發育不全患者不會導致嚴重不良生理學事件。

此外，各研究組中之全部患者均定期監測血液中血紅蛋白濃度、血液中血小板數目、血液電解質濃度、血液尿素氮濃度、血液肌酐濃度、血液鹼性磷酸酶濃度、血液丙胺酸轉胺酶濃度及血液天冬胺酸轉胺酶濃度。自三個研究組中每一組獲得的資料證實任何上述安全指標中均未觀測到臨床顯著改變，再次確認針對軟骨發育不全及相關症狀的CNP變異體肽療法的潛在安全性。

實例2-軟骨發育不全之十二個月人類臨床試驗資料（第3組）

在前6個月臨床試驗治療及評定時段之後，上文實例1中所述的第3組之10名軟骨發育不全患者繼續每日皮下投與之15 µg/ml Pro-Gly-CNP-37臨床方案持續額外6個月（總計12個月）。在額外六個月治療時段之過程期間，採用多種評定，包含體重、骨骼長度及骨骼生長之量測、包含計算上臂長度比前臂長度之比率、大腿長度比小腿長度之比率以及上半身長度比下半身長度之比率。亦藉由量測患者之站立高度來量測生長速度，且將資料與事先獲得之基線生長速率比較。

結果：在第3組（15 µg/kg/天）總共10名患者中，藉由量測治療期間之站立高度改變且與治療前量測之基線生長速率比較，量測用CNP變異體肽Pro-Gly-CNP-37治療12個月造成的生長速度改變。由此12個月研究獲得之資料證實，用15 µg/kg/天Pro-Gly-CNP-37治療12個月（第3組）的軟骨發育不全患者證實站立高度生長速度統計顯著增加（p值= 0.017）（與其事先計算的基線站立高度生長速率相比）。更具體言之，第3組之患者顯示站立高度生長速度1.9 cm/年的平均增加，此展現按年計算之生長速度高於基線超過47%的增加。此等資料表明軟骨發育不全患者用至少15 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療持續12個月或更久之時段，對骨骼生長、生長速度及軟骨發育不全的一般治療症狀具有有益作用。

身體比例.在治療之前（基線）及用CNP變異體肽治療過程期間，針對第3組中之10名患者計算身體比率（上半身長度比下半身長度、上臂長度比前臂長度以及大腿長度比小腿[膝蓋至腳部]長度）。

對於第3組，平均基線上半身長度比下半身長度比率、平均基線上臂長度比前臂長度比率以及平均基線大腿長度比小腿長度比率分別為1.91、1.13及0.69。用15 µg/kg CNP變異體肽每日皮下治療6個月之後，測得同

一身體比率分別為1.88、1.16及0.69，表明彼等同一身體比率的平均改變分別為-0.03、0.03及0.0。

此等資料表明在用CNP變異體肽治療12個月之後，因為全部所測量身體比率相對於基線之改變降至-0.05與0.05之間，用CNP變異體肽治療軟骨發育不全患者對整體身體比例不具有顯著不良影響。

不良事件.第3組中之全部患者針對不良事件（具體在治療過程期間由CNP變異體肽治療引起）之存在進行定期評定（如http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf 所定義）。第3組中無患者顯示2級或更高級別的確定與研究藥物有關的不良事件，表明用CNP變異體肽治療軟骨發育不全患者不會導致嚴重不良生理學事件。

此外，第3組中之全部患者均定期監測血液中血紅蛋白濃度、血液中血小板數目、血液電解質濃度、血液尿素氮濃度、血液肌酐濃度、血液鹼性磷酸酶濃度、血液丙胺酸轉胺酶濃度及血液天冬胺酸轉胺酶濃度。自此研究獲得之資料證實任何上述安全指標中均未觀測到臨床顯著改變，再次確認針對軟骨發育不全及相關症狀的CNP變異體肽療法的潛在安全性。

基於上文所述之人類臨床資料，向人類軟骨發育不全患者每日皮下投與30 µg/kg/天及60 µg/kg/天劑量的Pro-Gly-CNP-37亦將測試如上文所述之功效及安全性。基於本文所揭示之資料，完全預期此類投與方案將提供治療人類患者之軟骨發育不全的效用及安全性。

預期熟習此項技術者會想到如本文所述之實施例及說明性實例中所闡述的本發明之許多改良及變化。因此，僅在隨附申請專利範圍中呈現的此類限制應列入本發明中。

【序列表】

<110> 美商拜奧馬林製藥公司 (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.)

<120> C型利尿鈉肽變異體治療骨骼發育不良之用途

<140>

<141> 2016-08-01

<150> US-62/199,081

<151> 2015-07-30

<150> US-62/320,704

<151> 2016-04-11

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 3
<211> 38
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Pro Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 4
<211> 38
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Met Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 7
<211> 38
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種調配物，其包括：

（a）選自由以下組成之群的CNP變異體肽：

QEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（Met-CNP-37；SEQ ID NO:2）；

PQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（Pro-CNP-37；SEQ ID NO:3）；

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC
[Gly-CNP 37 (M32N)；SEQ ID NO:4]；

PGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5）；

MGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（Met-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:6）；以及

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
（Gly-CNP-37或CNP-38：SEQ ID NO:7）；以及

（b）一或多種選自由以下組成之群的組分：緩衝劑、等張劑、穩定劑及抗吸附劑。

【請求項2】

如請求項1之調配物，其中所述緩衝劑為單水合檸檬酸或二水合檸檬酸鈉。

【請求項3】

如請求項1之調配物，其中所述等張劑為二水合海藻糖或D-甘露糖醇。

【請求項4】

如請求項1之調配物，其中所述穩定劑為L-甲硫胺酸。

【請求項5】

如請求項1之調配物，其中所述抗吸附劑為聚山梨醇酯80。

【請求項6】

如前述請求項中任一項之調配物，其經凍乾。

【請求項7】

如請求項1之調配物，其為液體形式。

【請求項8】

如請求項7之調配物，其自凍乾調配物復原。

【請求項9】

如請求項1之調配物，其包括至少約2.0 mg/ml所述CNP肽變異體。

【請求項10】

如請求項1之調配物，其包括至少約10.0 mg/ml所述CNP肽變異體。

【請求項11】

如請求項1之調配物，其包括10.0 mg/ml所述CNP肽變異體。

【請求項12】

如請求項1之調配物，其包括單水合檸檬酸、二水合檸檬酸鈉、二水合海藻糖、D-甘露糖醇、L-甲硫胺酸以及聚山梨醇酯80。

【請求項13】

如請求項12之調配物，其中所述單水合檸檬酸以約0.15 mg/ml至約0.40 mg/ml的濃度存在，所述二水合檸檬酸鈉以約0.5 mg/ml至約1.5 mg/ml的濃度存在，所述二水合海藻糖以約30 mg/ml至約70 mg/ml的濃度存在，所述D-甘露糖醇以約10 mg/ml至約20 mg/ml的濃度存在，所述L-甲硫胺酸以約0.5 mg/ml至約1.5 mg/ml的濃度存在且所述聚山梨醇酯80以約0.01 mg/ml至約0.1 mg/ml的濃度存在。

【請求項14】

如請求項12之調配物，其中所述單水合檸檬酸以約0.28 mg/ml的濃度存在，所述二水合檸檬酸鈉以約1.08 mg/ml的濃度存在，所述二水合海藻糖以約58.01 mg/ml的濃度存在，所述D-甘露糖醇以約15 mg/ml的濃度存在，所述L-甲硫胺酸以約0.73 mg/ml的濃度存在且所述聚山梨醇酯80以約0.05 mg/ml的濃度存在。

【請求項15】

如請求項1之調配物，其不含防腐劑。

【請求項16】

如請求項1之調配物，其含於硼矽酸玻璃小瓶中。

【請求項17】

如請求項1之調配物，其pH介於約5.0與約6.0之間。

【請求項18】

如請求項1之調配物，其pH為約5.5。

【請求項19】

一種治療個體之骨骼發育不良之方法，其包括向所述個體投與包括CNP變異體肽的組合物的步驟，投與量為至少7.5 µg/kg所述CNP變異體

肽，其中所述CNP變異體肽選自由以下組成之群：

QEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Met-CNP-37；SEQ ID NO:2)；

PQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Pro-CNP-37；SEQ ID NO:3)；

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC
[Gly-CNP 37 (M32N)；SEQ ID NO:4]；

PGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5)；

MGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Met-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:6)；以及

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Gly-CNP-37或CNP-38: SEQ ID NO:7)，且其中所述投與步驟治療所述骨骼發育不良。

【請求項20】

如請求項19之方法，其中所述治療導致一或多種選自由以下組成之群的骨骼發育不良症狀改善：絕對生長增加、生長速度增加、QCT骨礦物質密度（BMD）增加、生長板形態改善、長骨生長增加、脊柱形態改善、肘關節運動範圍改善以及睡眠呼吸暫停減少。

【請求項21】

如請求項19之方法，其中所述骨骼發育不良選自由以下組成之群：軟

骨發育不全、軟骨生成減退、身材矮小、侏儒症、骨軟骨發育不良、致死性骨發育不良、成骨不全、軟骨成長不全、點狀軟骨發育不良、純合軟骨發育不全、點狀軟骨發育不良、屈肢骨發育不良、先天性致死型低磷酸酯酶症、圍產期致死型成骨不全、短肋多指畸形症候群、軟骨生成減退、肢根型點狀軟骨發育不良、揚森型幹骺端發育不良（Jansen-type metaphyseal dysplasia）、先天性脊椎骨骺發育不良、骨發育不全症、扭曲性骨發育不良、先天性股骨短、蘭格型肢中骨發育不良（Langer-type mesomelic dysplasia）、尼維格型肢中骨發育不良（Nievergelt-type mesomelic dysplasia）、羅比撓症候群（Robinow syndrome）、萊因哈特症候群（Reinhardt syndrome）、肢端發育不全、周圍骨發育障礙、凱乃斯特發育不良（Kniest dysplasia）、纖維軟骨生成、羅伯茨症候群（Roberts syndrome）、肢端肢中發育不全、小肢畸形、莫基奧症候群（Morquio syndrome）、凱乃斯特症候群（Kniest syndrome）、後生營養發育不良以及脊椎幹骺端發育不良。

【請求項22】

如請求項19之方法，其中所述骨骼發育不良為軟骨發育不全。

【請求項23】

如請求項19之方法，其中所述組合物每日投與一次。

【請求項24】

如請求項23之方法，其中所述組合物經至少6個月的時段每日投與一次。

【請求項25】

如請求項19之方法，其中所述組合物皮下投與。

【請求項26】

如請求項19之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約15 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽。

【請求項27】

如請求項19之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約30 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽。

【請求項28】

如請求項19之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約60 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽。

【請求項29】

如請求項19之方法，其中所述組合物包括如請求項1至18中任一項之調配物。

【請求項30】

如請求項19之方法，其中所述組合物包括如請求項14之調配物。

【請求項31】

一種增加個體之長骨生長之方法，其包括向所述個體投與包括CNP變異體肽之組合物的步驟，投與量為至少7.5 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽，其中所述CNP變異體肽選自由以下組成之群：

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Met-CNP-37；SEQ ID NO:2)；

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Pro-CNP-37 ; SEQ ID NO:3) ;

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC

[Gly-CNP 37 (M32N) ; SEQ ID NO:4] ;

PGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Pro-Gly-CNP-37 ; SEQ ID NO:5) ;

MGQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Met-Gly-CNP-37 ; SEQ ID NO:6) ; 以及

GQEHPNARKYKGANKKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Gly-CNP-37或CNP-38 : SEQ ID NO:7) , 且其中所述投與步驟增加
所述個體之長骨生長。

【請求項32】

如請求項31之方法，其中所述個體患有軟骨發育不全。

【請求項33】

如請求項31之方法，其中所述組合物每日投與一次。

【請求項34】

如請求項33之方法，其中所述組合物經至少6個月的時段每日投與一次。

【請求項35】

如請求項31之方法，其中所述組合物皮下投與。

【請求項36】

如請求項31之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約15 µg/kg所述CNP變異體肽。

【請求項37】

如請求項31之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約30 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽。

【請求項38】

如請求項31之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物，投與量為每天至少約60 $\mu\text{g/kg}$ 所述CNP變異體肽。

【請求項39】

如請求項31之方法，其中所述組合物包括如請求項1之調配物。

【請求項40】

如請求項31之方法，其中所述組合物包括如請求項14之調配物。

【請求項41】

一種增加有需要個體中之生長速度之方法，所述方法包括向所述個體投與包括CNP變異體肽之組合物的步驟，投與量為至少7.5 $\mu\text{g/kg}$ ，其中所述CNP變異體肽選自由以下組成之群：

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37(M32N)；SEQ ID NO:1]；

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Met-CNP-37；SEQ ID NO:2)；

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Pro-CNP-37；SEQ ID NO:3)；

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC
[Gly-CNP 37 (M32N)；SEQ ID NO:4]；

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC
(Pro-Gly-CNP-37；SEQ ID NO:5)；

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Met-Gly-CNP-37 ; SEQ ID NO:6) ; 以及

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

(Gly-CNP-37或CNP-38 : SEQ ID NO:7) , 且其中所述投與步驟增加所述個體中之生長速度。

【請求項42】

如請求項41之方法，其中所述個體患有軟骨發育不全。

【請求項43】

如請求項41之方法，其中所述生長速度增加為如按所述個體之站立高度所量測，高於基線至少25%的按年計算之生長速度的增加。

【請求項44】

如請求項41之方法，其中所述生長速度增加為如按所述個體之站立高度所量測，高於基線至少40%的按年計算之生長速度的增加。

【請求項45】

如請求項41之方法，其中所述生長速度增加藉由量測站立高度、坐高、體重、頭圍、上臂長度、下臂長度、大腿長度、小腿長度、手長或腳長來評定。

【請求項46】

如請求項41之方法，其中所述組合物每日投與一次。

【請求項47】

如請求項46之方法，其中所述組合物經至少6個月的時段每日投與一次。

【請求項48】

如請求項46之方法，其中所述組合物經至少12個月的時段每日投與一次。

【請求項49】

如請求項41之方法，其中所述組合物皮下投與。

【請求項50】

如請求項41之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物的步驟，投與量為每天至少約15 µg/kg所述CNP變異體肽。

【請求項51】

如請求項41之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物的步驟，投與量為每天至少約30 µg/kg所述CNP變異體肽。

【請求項52】

如請求項41之方法，其包括向所述個體投與包括所述CNP變異體肽之所述組合物的步驟，投與量為每天至少約60 µg/kg所述CNP變異體肽。

【請求項53】

如請求項41之方法，其中所述組合物包括如請求項1之調配物。

【請求項54】

如請求項41之方法，其中所述組合物包括如請求項14之調配物。

【請求項55】

如請求項41之方法，其不引起2級或更高級別的不良事件。

【請求項56】

如請求項41之方法，其不引起所述個體之血液中血紅蛋白濃度、血液中血小板數目、血液電解質濃度、血液尿素氮濃度、血液肌酐濃度、血液鹼性磷酸酶濃度、血液丙胺酸轉胺酶濃度或血液天冬胺酸轉胺酶濃度的臨床

顯著改變。

【請求項57】

如請求項41之方法，其導致介於-0.05與0.05之間的上半身長度比下半身長度比率的改變。

【請求項58】

如請求項41之方法，其導致介於-0.05與0.05之間的上臂長度比前臂長度比率的改變。

【請求項59】

如請求項41之方法，其導致介於-0.05與0.05之間的大腿長度比小腿長度比率的改變。

【請求項60】

如請求項41之方法，其中所述組合物非經腸投與。

【請求項61】

如請求項41之方法，其中所述組合物每日一次、每週3次、每週兩次、每週一次或每兩週一次投與。