(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0119179
(43) 공개일자 2019년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/03* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *C07K 14/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/03 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7029927(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년05월20일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7004835
원출원일자(국제) 2010년05월20일
심사청구일자 2018년03월20일
(85) 번역문제출일자 2019년10월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/035586
(87) 국제공개번호 WO 2010/135541
국제공개일자 2010년11월25일
(30) 우선권주장
61/180,112 2009년05월20일 미국(US)
61/254,563 2009년10월23일 미국(US)

(71) 출원인
바이오마린 파머수티컬 인크.
미합중국, 캘리포니아 94949, 노바토, 디지털 드라이브 105
(72) 발명자
웬트, 다니엘, 제이.
미합중국 캘리포니아 94588 월넛 크릭 라 비스타 로드 496
아오야기-스차르베르, 마이카
미합중국 캘리포니아 94941 밀 밸리 듀런트 웨이 383
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

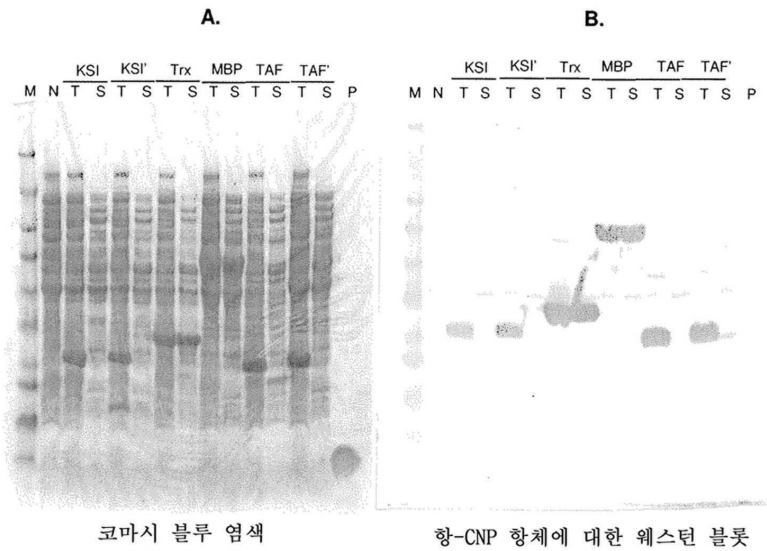
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 **씨형 나트륨이뇨 펩티드의 변이체**

(57) 요 약

본 발명은 C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic peptide, CNP)의 변이체(variant), CNP 변이체를 포함하는 약학적 조성물, CNP 변이체의 제조방법에 관한 것이다. 상기 CNP 변종은 이형성증(dysplasia (예컨대, 연골무형성증(achondroplasia)))같은, 골-관련 질병 또는 혈관 평활근 질병(vascular smooth muscle disorder (예컨대, 재협착(restenosis), 동맥경화증(arteriosclerosis)))을 포함하지만 이에 제한되지 않는, CNP 반응성 질병의 치료용 제제로 유용하다.

대 표 도 - 도1



코마시 블루 염색 항-CNP 항체에 대한 웨스턴 블롯

(52) CPC특허분류
A61K 38/10 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
A61K 47/60 (2017.08)
C07K 14/58 (2013.01)
(72) 발명자
롱, 시농
미합중국 캘리포니아 95035 밀피타스 카메론 서클 988
벨라드, 마이클, 클라우드
미합중국 캘리포니아 94901 산 라파엘 오크 드라이브 191
카스틸로, 씨에나
미합중국 캘리포니아 94121 샌프란시스코 #5 25 애비뉴 400
오크하마페, 어거스터스, 오.
미합중국 캘리포니아 94521 콩코드 크리스탈 랜치 드라이브 5310
프라이스, 크리스토퍼, 피.
미합중국 캘리포니아 94904 켄트필드 서 프란시스 드레이크 847

명 세 서

청구범위

청구항 1

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37);

GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP53) (서열번호 179);

PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP53) (서열번호 185);

MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP53) (서열번호 190);

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-53(M48N)] (서열번호 180);

LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-52) (서열번호 146);

RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-51) (서열번호 147);

VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-50) (서열번호 148);

DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-49) (서열번호 149);

TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-48) (서열번호 150);

KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-47) (서열번호 151);

SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-46) (서열번호 152);

RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-45) (서열번호 153);

AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-44) (서열번호 154);

AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-43) (서열번호 155);

WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-42) (서열번호 156);

ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-41) (서열번호 157);

RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-40) (서열번호 158);

LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-39) (서열번호 159);

LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (서열번호 160);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (서열번호 60);

EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-36) (서열번호 161);

HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-35) (서열번호 162);

PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34) (서열번호 163);

NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-33) (서열번호 164);

ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-32) (서열번호 165);

RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-31) (서열번호 166);

KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-30) (서열번호 167);

YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-29) (서열번호 168);

KGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-28) (서열번호 169);

GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-27) (서열번호 170);

ANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-26) (서열번호 171);

NKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-25) (서열번호 172);

KKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-24) (서열번호 173);

KGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-23) (서열번호 174);

LSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-21) (서열번호 175);

SKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-20) (서열번호 176);

KGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-19) (서열번호 177);

GCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-18) (서열번호 178);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (서열번호 182);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (서열번호 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (서열번호 192);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (서열번호 75);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (서열번호 181);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (서열번호 145);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA-CNP27) (서열번호 144);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (서열번호 183);

PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-HSA-CNP27) (서열번호 188);

MGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-CNP27) (서열번호 193);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEG1K-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEG1K-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEG1K-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEG1K-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

PEG1K-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEO12-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEO12-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEO12-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEO12-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

PEO12-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEO24-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEO24-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEO24-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEO24-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189); 및

PEO24-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194)으로 구성된 군에서 선택된 C-형 나트륨이뇨 펩티드 (C-type natriuretic peptide, 이하 CNP)의 변이체(variant).

청구항 2

CNP 변이체, 및 약학적으로 허용가능한 부형제(excipient), 담체(carrier) 또는 희석제(diluent)를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조성물은 동결건조 제제(lyophilized formulation)인 것을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 동결건조 제제는 약 4 내지 약 6의 pH값을 가지는 버퍼(buffer)를 포함하는 제제로부터 조제되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 버퍼는 시트르산/시트르산염(citric acid/citrate) 또는 아세트산/아세트산염(acetic acid/acetate)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 동결건조 제제는 등장성조절제(isotonicity-adjusting agent) 및/또는 증량제(bulking agent)를 더 포함하는 제제로부터 조제되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 등장성조절제 및/또는 상기 증량제는 만니톨(mannitol), 수크로오즈(sucrose), 소비톨(sorbitol), 및 그것들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조 제제는 항산화제(antioxidant)를 더 포함하는 제제로부터 조제되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항산화제는 메티오닌(methionine), 아스코르브산(ascorbic acid), 아스코르브산의 염, 티오글리세롤(thioglycerol) 및 그것들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CNP 변이체는 제1항의 CNP 변이체인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항의 CNP 변이체 또는 제2항 내지 제10항 중 어느 한 항의 약학적 조성물로서,

골관절염(osteoarthritis), 저인산혈성 구루병(hypophosphatemic rickets), 연골무형성증(achondroplasia), 연골저형성증(hypochondroplasia), 저신장증(short stature), 왜소증(dwarfism), 골연골이형성증(osteochondrodysplasias), 치사성이형성증(thanatophoric dysplasia), 골형성부전증(osteogenesis imperfecta), 연골무발생증(achondrogenesis), 점상연골형성장애(chondrodysplasia punctata), 연골발육부전(homozygous achondroplasia), 점상연골형성장애(chondrodysplasia punctata), 굴지형성이상(camptomelic dysplasia), 선천성 치사성저인산증(congenital lethal hypophosphatasia), 선천성 치사성 골형성부전증(perinatal lethal type of osteogenesis imperfecta), 짧은갈비골 다지증 증후군(short-rib polydactyly syndromes), 연골저형성증(hypochondroplasia), 점상연골이형성증(rhizomelic type of chondrodysplasia punctata), 젠슨형 골간단이형성증(Jansen-type metaphyseal dysplasia), 선천성척추골단이형성증(spondyloepiphyseal dysplasia congenita), 무지증(atelosteogenesis), 이영양성 형성이상(diastrophic dysplasia), 선천성대퇴골단축증(congenital short femur), 랭거형 전완부이형성증(Langer-type mesomelic dysplasia), 니버겔트형 전완부이형성증(Nievergelt-type mesomelic dysplasia), 로비나우 증후군(Robinow syndrome), 라인하르트 증후군(Reinhardt syndrome), 선단이골증(acrodysostosis), 말초골형성부전증

(peripheral dysostosis), 니스트 형성이상(Kniest dysplasia), 피브로콘드로제네시스(fibrochondrogenesis), 로버트 신드롬(Roberts syndrome), 전완하퇴말단의 형성이상(acromesomelic dysplasia), 소지증(micromelia), 모르큐이오 증후군(Morquio syndrome), 니스트 증후군(Kniest syndrome), 유기영양 이형성증(metatrophic dysplasia) 및 척추골단골간단 이형성증(spondyloepimetaphyseal dysplasia)으로 구성된 군에서 선택되는 뼈-관련 질병(bone-related disorder) 또는 골격 이형성증(skeletal dysplasia)의 치료용의 CNP 변이체 또는 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 뼈-관련 질병 또는 골격 이형성증은 연골무형성증(achondroplasia)인 것을 특징으로 하는 CNP 변이체 또는 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

고혈압(hypertension), 재협착(restenosis), 동맥경화증(arteriosclerosis), 급성 대상부전 심부전(acute decompensated heart failure), 심부전(congestive heart failure), 심부종(cardiac edema), 신 수종(nephredema), 간부종(hepatic edema), 급성신부전증(acute renal insufficiency) 및 만성신부전증(chronic renal insufficiency)으로 구성된 군에서 선택되는 혈관 평활근 질병(vascular smooth muscle disorder)의 치료용의 CNP 변이체 또는 약학적 조성물.

청구항 14

폴리뉴클레오티드에 의하여 암호화되는 융합 폴리펩티드의 발현을 유발하는 조건 하에서,

절단 가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 제2폴리뉴클레오티드와 연결되어 있는, CNP 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 제1뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 융합 단백질의 발현을 가능케 하는 조건하에서 배지에서 배양하는 것을 포함하고,

상기 융합 폴리펩티드는 절단 가능한 펩티드 또는 단백질에 직접적으로 연결되거나 링커를 통하여 간접적으로 연결되는 CNP 변이체 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는,

CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 숙주 세포는 절단 가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 연결된 CNP 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 융합 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현은 아이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드 유도 벡터(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible vector)를 이용하여 증폭되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 숙주 세포는 약 0.4 mM 내지 약 1.5 mM의 IPTG 존재 하, 약 20℃ 내지 약 40℃의 온도에서 한동안 배양되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 플라스미드는 pJexpress, pJexpress401, pJexpress404, pET-15b, pET-21a, pET-22b,

pET-31b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pMAL-c2X, pQE-30, pET-SUMO 및 pTYB11으로 구성된 군에서 선택되는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 가능한 펩티드 또는 단백질은 히스티딘 태그(histidine tags), 인간 전사인자 TAF12(human transcription factor TAF12), TAF12 단편(TAF12 fragments), TAF12 히스톤 접힘 도메인(TAF12 histone fold domain), TAF12의 돌연변이체(mutants of TAF12), 및 그것의 단편, 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), 케토스테로이드 아이소머라아제(ketosteroid isomerase),말토오즈-결합 단백질(maltose-binding protein), ß-갈락토시다아제(ß-galactosidase), 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(glutathione-S-transferase),티오레독신(thioredoxin), 키틴-결합 도메인(chitin-binding domain), BMP-2, BMP-2 돌연변이체(BMP-2 mutants), BMP-2(C/A), BMP-2(C/A)의 돌연변이 및 그것들의 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 절단 가능한 펩티드 또는 단백질은 인간 전사인자 TAF12(human transcription factor TAF12), TAF12 단편(TAF12 fragments), TAF12 히스톤 접힘 도메인(TAF12 histone fold domain), TAF12의 돌연변이체, 및 그의 단편, 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), 및 TAF12(C/A & 10D/10E)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 절단 가능한 펩티드 또는 단백질은 절단제(cleaving agent)에 의하여 절단되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 절단제는 포름산(formic acid), 시아노겐 브로마이드(cyanogen bromide;CNBr), 히드록실아민(hydroxylamine), 단백질 자가 절단 (protein self cleavage), 인자 Xa(Factor Xa), 엔테로키나아제(enterokinase), ProTEV, 및 SUMO 프로테아제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 박테리아인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 박테리아 숙주 세포는 이콜라이(*E. coli*) 인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 이콜라이(*E. coli*)세포는 BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41(DE3), C43(DE3), Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX 및 Tuner(DE3)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 이콜라이(*E. coli*)세포는 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 28

제14항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 수용성 단백질 또는 봉입체(inclusion

body)로서 발현되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 29

제14항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 숙주 세포 또는 배양배지로부터 발현된 융합 폴리펩티드를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 방법은 포름산(formic acid), 시아노겐 브로마이드(cyanogen bromide;CNBr), 히드록실아민(hydroxylamine), 단백질 자가 절단(protein self cleavage), 인자 Xa(Factor Xa), 엔테로키나아제(enterokinase), ProTEV, 및 SUMO 프로테아제로 구성된 군에서 선택되는 절단제와 분리한 융합 단백질을 접촉하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 절단제는 포름산(formic acid)인 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 절단제와 상기 분리된 융합 폴리펩티드의 접촉은 약 50℃ 내지 약70℃의 온도에서 약1% 내지 약10%의 포름산 존재하에서 수행하는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 포름산 존재하 접촉단계는 약 5시간 내지 약 36시간의 시간동안 수행하는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 34

제14항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은

R-CNP22(K4R) (Analog AZ) (서열번호 41);

ER-CNP22(K4R) (Analog BA) (서열번호 39);

GANPR-CNP22(K4R) (Analog CI) (서열번호 37);

GANQQ-CNP22(K4R) (Analog CH) (서열번호 69);

AAWARLLQEHPNA-CNP22 (Analog CA) (서열번호 61);

AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (Analog CB)(서열번호 62);

DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (Analog CC) (서열번호 63);

GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (Analog CF) (서열번호 79);

GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (Analog CE) (서열번호 81);

GHHSHEQHPHGANQQ-CNP22 (Analog CQ) (서열번호 76);

GQEHPNARKYKGANPK-CNP22 (Analog CS) (서열번호 71);

GQEHPNARKYKGANQK-CNP22 (Analog CT) (서열번호 130);

GAHHPHEHDTHGANQQ-CNP22 (Analog CR) (서열번호 77);

GQTHSSGTQSGANQQ-CNP22(K4R) (Analog CN) (서열번호 87);

SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (Analog CD) (서열번호 68);

PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP53) (서열번호 179);

PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP53) (서열번호 185);

MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP53) (서열번호 190);

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-53(M48N)] (서열번호 180);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (서열번호 60);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (서열번호 182);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (서열번호 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (서열번호 192);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (서열번호 75);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (서열번호 181);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (서열번호 145);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (서열번호 191);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA-CNP27) (서열번호 144);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (서열번호 183);

PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-HSA-CNP27) (서열번호 188); 및

MGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-CNP27) (서열번호 193)

으로 구성된 군에서 선택되는 CNP 변이체를 생산하는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 35

제14항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 CNP-22 또는 CNP-53을 생산하지 않는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체의 재조합 생산 방법.

청구항 36

제14항 내지 제33항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 생산된 CNP 변이체로서, 상기 CNP 변이체는

R-CNP22(K4R) (Analog AZ) (서열번호 41);

ER-CNP22(K4R) (Analog BA) (서열번호 39);

GANPR-CNP22(K4R) (Analog CI) (서열번호 37);

GANQQ-CNP22(K4R) (Analog CH) (서열번호 69);

AAWARLLQEHPNA-CNP22 (Analog CA) (서열번호 61);

AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (Analog CB)(서열번호 62);

DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (Analog CC) (서열번호 63);

GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (Analog CF) (서열번호 79);

GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (Analog CE) (서열번호 81);

GHHSHEQHPHGANQQ-CNP22 (Analog CQ) (서열번호 76);

GQEHPNARKYKGANPK-CNP22 (Analog CS) (서열번호 71);

GQEHPNARKYKGANQK-CNP22 (Analog CT) (서열번호 130);

GAHHPHEHDTHGANQQ-CNP22 (Analog CR) (서열번호 77);

GQTHSSGTQSGANQQ-CNP22(K4R) (Analog CN) (서열번호 87);

SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (Analog CD) (서열번호 68);

PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)];

PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)];

MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)];

GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP53) (서열번호 179);

PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP53) (서열번호 185);

MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP53) (서열번호 190);

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-53(M48N)] (서열번호 180);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (서열번호 60);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (서열번호 182);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (서열번호 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (서열번호 192);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (서열번호 75);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (서열번호 181);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (서열번호 145);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (서열번호 191);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA-CNP27) (서열번호 144);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (서열번호 183);

PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-HSA-CNP27) (서열번호 188); 및

MGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-CNP27) (서열번호 193)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP 변이체.

청구항 37

발현 벡터를 포함하는 숙주세포로서,

상기 벡터는 절단 가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 제2폴리뉴클레오티드와 연결되어 있는, CNP 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 제1뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 절단 가능한 펩티드 또는 단백질은 히스티딘 태그(histidine tags), 인간 전사인자 TAF12(human transcription factor TAF12), TAF12 단편(TAF12 fragments), TAF12 히스톤 접힘 도메인(TAF12 histone fold domain), TAF12의 돌연변이체(mutants of TAF12) 및 그의 단편, 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), 케토스테로이드 아이소머라아제(ketosteroid isomerase),말토오즈-결합 단백질

(maltose-binding protein), ß-갈락토시다아제(ß-galactosidase), 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(glutathione-S-transferase),티오레독신(thioredoxin), 키틴-결합 도메인(chitin-binding domain), BMP-2, BMP-2 돌연변이체(BMP-2 mutants), BMP-2(C/A), BMP-2(C/A)의 돌연변이체 및 그것들의 단편으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 숙주 세포는 박테리아인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 박테리아 숙주 세포는 이콜라이 (*E.coli*)인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 이콜라이 (*E.coli*) 세포는 BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41(DE3), C43(DE3), Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX 및 Tuner(DE3)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 이콜라이 (*E.coli*) 세포는 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 플라스미드는 pJexpress, pJexpress401, pJexpress404, pET-15b, pET-21a, pET-22b, pET-31b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pMAL-c2X, pQE-30, pET-SUMO 및 pTYB11으로 구성된 군에서 선택되는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 45

제37항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 세포 배양 전에 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 46

제37항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드에 의하여 암호화되는 융합 폴리펩티드의 발현에 적절한 조건 하에서 배지에서 배양되고,

상기 융합 폴리펩티드는 절단 가능한 펩티드 또는 단백질에 직접적으로 연결되거나 링커를 통하여 간접적으로 연결되는 CNP 변이체 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 상기 융합 폴리펩티드는 수용성 단백질 또는 봉입체로 발현된 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 상기 발현된 융합 폴리펩티드는 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 분리된 것을 특

징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 분리된 융합 폴리펩티드는 포름산(formic acid), 시아노겐 브로마이드(cyanogen bromide;CNBr), 히드록실아민(hydroxylamine), 단백질 자가 절단(protein self cleavage), 인자 Xa(Factor Xa), 엔테로키나아제(enterokinase), ProTEV, 및 SUMO 프로테아제로 구성된 군에서 선택되는 절단제와 접촉되는 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 50

제37항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CNP 변이체 폴리펩티드는 CNP-22 또는 CNP-53가 아닌 것을 특징으로 하는, 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 51

적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준에 대한 대상에서의 CNP 펩티드 또는 CNP 변이체의 효과를 평가하는 방법으로서, 상기 방법은 CNP펩티드 또는 CNP 변이체가 투여된 대상으로부터 얻어진 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준을 분석하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는, CNP 펩티드 또는 CNP 변이체의 효과를 평가하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 방법은 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준을 분석하기 전에 대상에 CNP 펩티드 또는 CNP 변이체를 투여하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, CNP펩티드 또는 CNP 변이체의 효과를 평가하는 방법.

청구항 53

CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

CNP 펩티드 또는 변이체를 대상에 투여하는 단계, 및

대상에서 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준을 모니터링 하는 단계를 포함하며,

적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준이 증가하는 것은 상기 대상 또는 질환 또는 질병에 있어서 CNP 펩티드 또는 변이체가 치료학적 효과가 있다는 것을 의미하는 것을 특징으로 하는, CNP-반응 상태 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 방법은 CNP 펩티드 또는 변이체의 투여량 또는 투여 빈도를 조정하는 것을 더 포함하는 것으로,

ⅰ) CNP 펩티드 또는 변이체의 투여량 또는 투여빈도는, 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준이 목표 수준보다 낮다면 증가되는 것이거나; 또는

ii) CNP 펩티드 또는 변이체의 투여량 또는 투여빈도는, 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 수준이 목표 수준보다 높다면 감소되는 것을 특징으로 하는, CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 뼈 또는 연골-관련 바이오마커는 CNP, cGMP, 콜라겐 II형 프로펩티드 및 그것들의 단편, 콜라겐 II형 및 그것들의 단편 (collagen type II and fragments thereof), 오스테오칼신(osteocalcin), 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen,PCNA), I형 프로콜라겐(type I procollagen, PINP)의 프로펩티드 및 그의 단편, 콜라겐 I형 및 그것들의 단편(collagen type I and fragments thereof), 아그리칸 콘드로이틴 설페이트(aggrecan chondroitin sulfate) 및 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체는,

R-CNP22(K4R) (Analog AZ) (서열번호 41);

AAWARLLQEHPNA-CNP22 (Analog CA) (서열번호 61);

AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (Analog CB) (서열번호 62);

DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (Analog CC) (서열번호 63);

GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (Analog CF) (서열번호 79);

GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (Analog CE) (서열번호 81);

GHHSHEQHPHGANQQ-CNP22 (Analog CQ) (서열번호 76);

GQEHPNARKYKGANPK-CNP22 (Analog CS) (서열번호 71);

GQEHPNARKYKGANQK-CNP22 (Analog CT) (서열번호 130);

GAHHPHEHDTHGANQQ-CNP22 (Analog CR) (서열번호 77);

GQTHSSGTQSGANQQ-CNP22(K4R) (Analog CN) (서열번호 87);

SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (Analog CD) (서열번호 68);

GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP53) (서열번호 179);

PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP53) (서열번호 185);

MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP53) (서열번호 190);

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-53(M48N)] (서열번호 180);

DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-53) (서열번호 4);

LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-52) (서열번호 146);

RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-51) (서열번호 147);

VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-50) (서열번호 148);

DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-49) (서열번호 149);

TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-48) (서열번호 150);

KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-47) (서열번호 151);

SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-46) (서열번호 153);

RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-45) (서열번호 153);

AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-44) (서열번호 154);

AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-43) (서열번호 155);

WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-42) (서열번호 156);

ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-41) (서열번호 157);

RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-40) (서열번호 158);

LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-39) (서열번호 159);

LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (서열번호 160);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (서열번호 60);

EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-36) (서열번호 161);

HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-35) (서열번호 162);

PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34) (서열번호 163);

NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-33) (서열번호 164);

ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-32) (서열번호 165);

RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-31) (서열번호 166);

KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-30) (서열번호 167);

YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-29) (서열번호 168);

KGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-28) (서열번호 169);

GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-27) (서열번호 170);

ANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-26) (서열번호 171);

NKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-25) (서열번호 172);

KKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-24) (서열번호 173);

KGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-23) (서열번호 174);

GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-22) (서열번호 1);

LSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-21) (서열번호 175);

SKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-20) (서열번호 176);

KGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-19) (서열번호 177);

GCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-18) (서열번호 178);

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (서열번호 181);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP37) (서열번호 186);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP37) (서열번호 191);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37) (서열번호 75);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (서열번호 181);

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (서열번호 145);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP37) (서열번호 191);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA-CNP27) (서열번호 144);

GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (서열번호 183);

PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-HSA-CNP27) (서열번호 188);

MGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-CNP27) (서열번호 193);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEG1K-CNP22 (서열번호 1);

PEO12-CNP22 (서열번호 1);

PEO24-CNP22 (서열번호 1);

PEO12-R-CNP22(K4R) (서열번호 41);

PEO24-R-CNP22(K4R) (서열번호 41);

PEO12-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39);

PEO24-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39);

PEO12-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37);

PEO24-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37);

PEO12-GANQQ-CNP22(K4R) (서열번호 69);

PEO24-GANQQ-CNP22(K4R) (서열번호 69);

PEG1K-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEG1K-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEG1K-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEG1K-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

PEG1K-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEG1K-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEO12-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEO12-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEO12-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEO12-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

PEO12-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO12-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194);

PEO24-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

PEO24-GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [PEO24-CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

PEO24-PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189); 및

PEO24-MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [PEO24-Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194)

로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체는 CNP-22 또는 CNP-53이아닌 것을 특징으로 하는, CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic peptide, CNP)의 변이체(variant), CNP 변이체를 포함하는 조성물, CNP 변이체의 제조방법 및 골격형성장애(skeletal dysplasia) (예를 들어, 연골무형성증(achondroplasia))와 같은 뼈-관련 질병(bone-related disorder) 및 혈관 평활근 질병(vascular smooth muscle disorder)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 CNP에 반응하는 질병을 치료하기 위한 CNP 변이체의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 나트륨이뇨 펩티드 족은 3가지 구조적으로 관련된 펩티드들로 구성된다: 심방성 나트륨이뇨 펩티드(atrial natriuretic peptide, ANP; Genbank Accession No. NP_006163, ANP 전구체 단백질(ANP precursor protein, NPPA)에 대한), 뇌성 나트륨이뇨 펩티드(brain natriuretic peptide, BNP; GenBank Accession No. NP_002512, BNP 전구체 단백질(BNP precursor protein, NPPB)에 대한) 및 C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic

peptide, CNP) (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990) (GenBank Accession No. NP_077720, CNP 전구체 단백질(CNP precursor protein, NPPC)에 대한) (J. Hypertens., 10: 907-912 (1992)). 상기 작고, 단일한 사슬 펩티드들 (ANP, BNP, CNP)은 17-아미노산 루프 구조 (Levin et al., N. Engl. J. Med., 339: 863-870 (1998))를 가지고 다양한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다. ANP 및 BNP는 구아날릴 사이클라제 A(guanalyl cyclase A, GC-A)라고도 불리우는, 나트륨이뇨 펩티드 수용체 A(natriuretic peptide receptor A, NPR-A)에 결합하여 나트륨이뇨 펩티드 수용체 A(natriuretic peptide receptor A, NPR-A)를 활성화시켜서, 세포 내 사이클릭 구아노신 모노포스페이트(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)가 더 높은 레벨로 존재하도록 한다. 마찬가지로, CNP는 cGMP의 생성을 자극하기 위하여 NPR-B (GC-B)와 반응한다 (J. Hypertens., 10: 1111-1114 (1992)). 수용체의 세 번째 유형인, NPR-C는 각각의 나트륨이뇨 펩티드에 높은 친화력을 가지고 결합하여 우선적으로 세포외 구획으로부터 펩티드를 포획하고 상기 펩티드를 그것들이 분해되는 리소좀(lysosome)에 저장한다 (Science, 238: 675-678 (1987)). ANP 및 BNP는 심장의 근육 세포 내부에서 우선적으로 생산되고, 심혈관 항상성 유지에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다 (Science, 252: 120-123 (1991)). CNP는 중추신경계, 생식관, 뼈 및 혈관의 상피에서 더 광범위하게 발현된다 (Hypertension, 49: 419-426 (2007)).

[0003] 인간의 CNP는 단일한 사슬 126-아미노산 프리-프로 폴리펩티드(pre-pro polypeptide)로서 나트륨이뇨 펩티드 전구체 C(natriuretic peptide precursor C, NPPC) 유전자로부터 처음 생산된다 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990)). 상기 단일 펩티드의 제거로 프로-CNP를 수득하고, 나아가 엔토프로테아제 퓨린에 의한 절단은 활성 53-아미노산 펩티드(53-amino acid peptide, CNP-53)를 생산하며, 이것이 분비되어 이름이 알려지지 않은 효소에 의하여 다시 쪼개져, 성숙한 22-아미노산 펩티드(22-amino acid peptide, CNP-22)가 생성된다 (Wu, J. Biol. Chem. 278: 25847-852 (2003)). CNP-53 및 CNP-22는 다르게 분배되는데, CNP-53은 조직에서 우세한 반면, CNP-22는 주로 혈장 및 뇌척수액에서 발견된다 (J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res., 26: 269-297 (2006)). 연골에서 우세한 CNP형은 알려져 있지 않다. CNP-53 및 CNP-22 모두 NPR-B에 비슷하게 결합한다. 더욱이, 그들 모두 용량-의존성(does-dependent) 및 비슷한 양식으로 cGMP 생산을 유발한다 (VT Yeung, Peptides, 17: 101-106 (1996)).

[0004] 천연의 CNP 유전자 및 폴리펩티드는 과거 기술되었다. 미국 특허 제 5,352,770호는 인간 CNP 시퀀스와 동일한 돼지 뇌로부터 분리 및 정제된 CNP-22 및 그것의 심혈관증 치료 용도에 대하여 개시한다. 미국 특허 제 6,034,231호는 프로 CNP (126 아미노산)의 인간 유전자 및 폴리펩티드 및 인간 CNP-53 유전자 및 폴리펩티드를 개시한다.

[0005] 세포외 공간으로부터 CNP의 제거는 막-결합 중성 엔도펩티다제(membrane-bound neutral endopeptidase, NEP)에 의하여 발생하는데, 이것은 CNP를 빠르게 분해하며 (Biochem. J., 291 (Pt 1): 83-88 (1993)), NPR-C를 통하여, CNP와 결합하고 CNP를 리소좀에 저장하면, CNP가 분해된다. CNP는 정상적인 인간의 신체 내에서 2.6분의 반감기를 가지고 있음이 보고되었다 (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). CNP의 낮은 혈장 농도(J. Bone Moner. Res., 19 (Suppl.1)S20 (2004)) 및 다수의 조직에서 NPR-B와 CNP의 공동-발현은 CNP가 우선적으로 자가분비/근거리분비(autocrine/paracrine)를 통하여 기능하고 있음을 제시한다.

[0006] 상기 언급한 바와 같이, CNP는 구아날릴 사이클라제 B(guanylyl cyclase B, GC-B)라고도 불리는 나트륨이뇨 펩티드 수용체 B(natriuretic peptide receptor B, NPR-B)에 결합하고 이를 활성화시켜서, 세포내 사이클릭 구아노신 모노포스페이트 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)가 더 높은 수준으로 존재하도록 한다. cGMP 생성에 의하여 매개되는 하위 신호전달체계(Downstream signaling)는 연골내골화(endochondral ossification)를 포함하는 생물학적 과정의 다양한 배열에 영향을 미친다. 그러므로, 상기 경로에 있어서, 구성 중 일부의 증가 또는 감소된 레벨은 뼈 성장 이상을 초래할 수 있다. 예를 들어, 마우스 모델에서 CNP 또는 NPR-B의 녹아웃(knockout)은, 동물에 있어서 더 짧아진 장골(long bones) 및 척추를 가지는, 난장이 표현형을 가지도록 한다. 적절한 CNP 신호 전달을 막는 인간 NRP-B의 돌연변이가 확인되었고 이것은 왜소증을 초래한다 (Olney, *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 91(4): 1229-1232 (2006); Bartels, *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 75: 27-34 (2004)). 반면, 증가된 수준의 CNP를 생산하기 위하여 조작된 마우스는 긴 장골 및 척추를 나타낸다.

[0007] 연골무형성증(achondroplasia)은 피브로블라스트 성장 인자 수용체 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR-3)의 유전자에서 상염색체 우성 돌연변이의 결과이고, 연골 형성 기형의 원인이 된다. 일반적으로 FGFR-3은 연골 성장 및 이에 따른 뼈 성장에 있어서 음성 조절 효과의 효과를 가진다. 연골무형성증(achondroplasia)에서, 상기 FGFR-3의 돌연변이 형이 본질적으로 활성화되어, 뼈가 심각하게 짧아지게 된다. 연골세포의 증식 및 분화를 모두 방해하여, 매우 짧은 성장판 연골의 원인이 된다 (P. Krejci et al., J. Cell Sci. 118: 5089-5100 (2005)). 연골내골화(endochondral ossification)는 수직의 장골 형성을 좌우하는 과정이다. 성장판에는

4개의 구역이 존재한다.- 휴지(resting), 증식(proliferative), 비후(hypertrophic) 및 석회침착(calcification)의 구역이 그것이다. 성장판에서, NPR-B는 증식성 세포에 의해 발현되는 반면, NPR-B는 비후성 세포에 의하여 발현된다 (Yamashite et al., J. Biochem. 127: 177-179 (2000)). 정상적인 연골 내 뼈 성장에 있어서, 연골세포는 컬럼(column)에서 조직화되고 성장판의 증식 구역에서 증식한다. 상기 컬럼은 연골무형성증(achondroplasia) 환자에서 조직이 파괴된다. 덧붙이면, 상기 비후 구역은 세포를 크게 만들고 결국 세포자살(apoptose)(용해, lyse)이 일어나도록 하여, 골세포(osteocyte) 침입 및 무기물화(mineralization)의 원인이 된다. 상기 비후성 연골세포 및 상기 구역의 전체적인 크기는 정상인보다 연골무형성증 환자에 있어서 훨씬 작다. CNP는 연골세포 및 뼈 성장의 양성 조절자인 NPR-B에 대한 작용자(agonist)이다. CNP/NPR-B의 하위 신호전달체계(Downstream signaling)는 미토겐-활성화된 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAP K) 수준에서 FGFR-3 경로를 저해한다. MAP K의 저해는 성장판의 증식 및 비후 구역에서 연골세포의 증식 및 분화를 촉진하여, 뼈 성장이라는 결과를 가져온다.

[0008] 인간에게 있어서 FGFR-3의 활성 돌연변이는 유전적 왜소증의 주요한 원인이다. 활성화된 FGFR-3를 가지는 마우스는 골격 이형성증(skeletal dysplasia)의 가장 흔한 유형인, 연골무형성증(achondroplasia)의 모델로서 제공되고 있고, CNP의 과발현은 왜소증으로부터 이러한 동물들을 구제한다. 따라서, CNP 및 CNP의 기능적인 변이체는 다양한 골격 이형성증(skeletal dysplasia)의 치료용으로서 가능성이 있다.

[0009] CNP의 치료학적 용도는 최근 그것의 짧은 혈장 반감기 때문에 제한되고 있는데, 혈장 반감기는 인간의 신체 내에서 2.6분을 나타낸다 (J Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). 인간 혈장에서 발견되는 전형적인 고유한 수준(약 5pM)의 이상으로 CNP 농도를 증가시키기 위하여, 체계적으로 투여된 CNP를 이용하는 모든 인간 및 동물 실험에서 계속적인 투입이 필요하게 되었다. 생체 내에서 더 길어진 혈청 반감기를 가지고 야생형 CNP에 대하여 비슷하거나 증가된 활성을 가지는 CNP 변이체는 지속가능한 치료 계획에 있어서 중요하다. CNP의 반감기에 의한 2가지 메커니즘은 인간 플라스마에서 중성 엔도펩티다제(neutral endopeptidase, NEP)에 의한 분해와 나트륨이뇨 펩티드 수용체 C(natriuretic peptide receptor C, NPR-C)에 의한 제거이다 (Growth Horm. & IGF Res., 16: S6-S14 (2006)). 펩티드의 변형은 엔도펩티다제(endopeptidase) 및 엑소펩티다제(exopeptidase)에 대한 저항성을 향상시킬 수 있다고 보고되어 있다 (Amino Acids, 30: 351-367 (2006); Curr. Opin. Biotech., 17: 638-642 (2006)).

[0010] CNP의 다양한 유사체 및 유도체의 상기 생물학적 활동이 평가되었다. Cys_6 및 Cys_{22}를 대신하여 S-메틸 Cys로 치환함에 따라, Cys6-Cys22 이황화 결합을 통한 펩티드의 고리화는 cGMP 형성을 자극함에 있어서 CNP의 활성에 대하여 중요성을 가지는 것으로 보고되었다 (Biochem. Biophys. Res. Comm., 183: 964-969 (1992), 아울러 아미노산을 확인하기 위하여 알라닌 스캐닝을 이용하는 것은 CNP 기능성에 대하여 중요성을 가지는 것으로 보였다. 활성의 현저하고 추가적인 상승은 아미노산 Leu_9, Lys_{10}, 및 Leu_1의 조합에 따른 결과인 것으로 보고되었다. 미국 특허 제5,434,133호는 아미노산 포지션 6, 7, 9, 11 또는 22에서 치환된 CNP-22를 포함하는 CNP 유사체를 기술하고, 여기에 있어서, 상기 아미노산의 포지션 6에서 Cys 또는 Pmp(pentacyclomercaptopropionic acid)로부터 선택된 것이고, 포지션 7에서 Phe, 4-클로로-Phe, 4-플루오로-Phe, 4-나이트로-Phe 또는 Cha (3-사이클로헥실-Ala)로부터 선택된 것이며, 포지션 9에서 Gly, Val, Aib 또는 tLeu로부터 선택된 것이며, 포지션 11에서 Leu 또는 Ile로부터 선택된 것이며, 포지션 22에서 Cys 또는 Pmp로부터 선택된 것이다.

[0011] 미국 특허 공개 제2004/0138134호 (현재, 미국 특허 제7,276,481호)는 포지션 9, 10, 11, 16, 17, 19 또는 20에서 또 다른 천연 아미노산을 위한 적어도 하나의 치환을 포함하는 CNP-22의 Cys_6 내지 Cys_{22}의 아미노산을 포함하는 CNP 변이체("CNP-17"), Cys_6 와 Phe_7 사이의 NEP 절단의 일차 작용점으로 알려진 곳에서의 His 잔기 첨가와 같이, 삽입 및 결실된 CNP 변이체, 및 비정상적인 뼈 및 정상적인 골의 신장에 있어서 뼈 성장판의 크기를 증가시키기 위하여 상기와 같은 변이체를 이용하는 방법을 기술한다. 그러나, cGMP 생산에 의하여 측정된 활성에서 상기 변이체들에 대하여 어떠한 잇점도 발견되지 않는다는 것을 알 수 있었고, 생체 외 세포-기반법에서 관찰된 것과 같이(실시예 7), 상기 활성은 거의 모든 변이체들에 있어서 사라졌다. 더욱이 예를 들어 생체외 안정성 또는 생체내 향상된 약물동태성(pharmacokinetics, PK)의 결정과 같은 보충 데이터가, 주장된 NEP 저항성 및 CNP 유사체의 NPR-C 저항성을 입증하기 위하여 제출되지 않았다. 미국 특허 제6,743,425호는 NPR-B/GC-B를 활성화하여 연골무형성증(achondroplasia)을 치료하고 펩티드 또는 저분자량 화합물이며, C-형 나트륨이뇨 펩티드 CNP-22 및 CNP-53을 포함하는 물질을 개시한다. PCT 공개 특허 제94/20534호는 바소나트륨 펩티드(vasonatrin peptide, VNP)로써 지칭된 CNP22 및 ANP의 5-아미노산 C 말단의 키메라(chimera)로서 이황화물 또는 이중 결합의 생성에 기인한 제한된 수의 아미노산 치환체 및 사이클릭 키메릭 펩티드(cyclic chimeric

peptides)를 개시한다.

[0012] 다른 나트륨이뇨 펩티드족 구성원의 반감기를 향상시키기 위한 접근은 NPR-C에 대한 ANP의 친화성 감소 (U.S. Patent No. 5,846,932), NPR-C의 펜타펩티드 안타고니스트(pentapeptide antagonists)의 이용 (WO 00/61631) 및 티오르판(thiorphan) 및 칸도자트릴(candoxatril)과 같은 NEP 저해제의 공동-투여 (Clin. Exp. Pharma. Physiol., 25: 986-991 (1997), Hyperten., 30: 184-190 (1997))를 포함한다. WO 2004/047871는 폴리알킬렌 글라이콜(polyalkylene glycol) 모이어티, 당(sugar) 모이어티, 폴리소르베이트(polysorbate) 모이어티, 폴리캐타이오닉(polycationic) 모이어티 및 순환계에서 반감기를 향상시키고 일반적으로 급성 울혈성심부전증(congestive heart failure)의 치료에 유용하다고 알려진 다른 친수성 폴리머 잔기에 대한 BNP의 컨쥬케이트(conjugates) 및 BNP 변이체에 대하여 기술한다.

[0013] 그러나, 기능을 유지하면서 NEP에 대한 저항성을 가지는 CNP를 만드는 성공적인 전략은 어느 리포트에서도 공개된 적이 없다.

선행기술문헌

[0014] 미국특허 제6,329,375호

[0015] 미국특허 제6,344,459호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 뼈-관련 질병 (예를 들어, 연골무형성증) 및 혈관 평활근 질병(vascular smooth muscle disorder)의 치료에 유용한 C-형 나트륨이뇨 펩티드(C-type natriuretic peptide, CNP)의 변이체에 관한 것이다. 본 발명은 예를 들면, CNP의 기능을 유지하면서, 감소된 중성 엔도펩티다제(neutral endopeptidase, NEP) 결합력, NEP에 의한 단백질분해(proteolysis)에 대한 저항성의 증대 및/또는 제거 나트륨이뇨 펩티드 수용체 C(natriuretic peptide receptor C, NPR-C)에 대한 감소된 결합력의 결과로서, 증가된 혈청 반감기를 가지는 CNP 변이체에 관한 것이다.

[0017] 야생형의 인간 CNP-22 시퀀스 (본 발명에서 "hCNP22", "wtCNP22" 또는 "CNP22"이라 지칭하는 것)은 하기와 같이 구성된다:

[0018] (N-말단) Gly1-Leu2-Ser3-Lys4-Gly5-Cys6-Phe7-Gly8-Leu9-Lys10-Leu11-Asp12-Arg13-Ile14-Gly15-Ser16-Met17-Ser18-Gly19-Leu20-Gly21-Cys22 (서열번호 1). CNP22의 6 내지 22 포지션은 Cys6와 Cys22 사이에서 이황화 결합으로 사이클릭 도메인(cyclic domain)을 형성한다. 상기 17-아미노산 사이클릭 구조는 CNP가 NPR-B에 결합하기 위하여 중요한 것으로 보여졌다 (Schiller, Biochem. Biophys. Res. Commun., 138: 880-886 (1986)). CNP22의 6 내지 22 포지션의 아미노산 시퀀스는 본 발명에서 "CNP17"로 지칭된다 (서열번호 2).

[0019] CNP는 다수의 작용점에서 NEP 절단에 민감하다 : Cys6-Phe7, Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17 and Gly19-Leu20. 일 구현예에서, 본 발명은 (1) 그것의 전체적인 사이즈를 증가시키거나 또는 예를 들어, 약2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 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, 또는 약 7 kDa, 7.2 kDa, 또는 약 8.2 kD 범위의 분자량을 가지도록 변형, 및/또는 (2) 상기 나열한 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 부위 전체에서, NEP 제거에 대한 민감성을 감소하는 어떤 아미노산 포지션에서 변형된 CNP 변이체를 포함한다. 상기 CNP 변이체의 사이즈 또는 분자량은 다양한 방법에 의하여 증가될 수 있는데, 예를 들면, 추가적인 아미노산 및/또는 다른 종류의 화합물(예를 들어, 천연 또는 합성 중합체)이 N-말단, C-말단 및/또는 곁사슬에서 펩티드 시퀀스로 컨쥬게이트됨에 따라 및/또는 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 및/또는 더 거대한 곁사슬을 가진 펩티드모방체(peptidomimetic)를 이용함에 따라 증가될 수 있다. 상기 CNP 변이체는 선택적으로 다른 기능 또는 구조 모이어티에 추가로 컨쥬게이트된다. 선택적으로 본 발명에 기술된 어떤 구현예들의 조합에 있어서, 돌연변이(들) (예를 들어, 치환(들), 첨가(들), 및/또는 결실(들))는 CNP 변이체의 NPR-C에 대한 결합을 감소시키기 위하여 CNP22의 특정 포지션으로 도입될 수 있다. 예를 들면, 보존적 치환(conservative substitutions) 또는 당업계에 알려진 다른 변형과 같은 추가적인 변형이 NEP 저항 또는 CNP 활성 없이 행해질 수 있다.

[0020] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 다음의 일반적인 구조식으로 표현된다: (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) (서열번호 5), 여기에 있어서,

[0021] 상기 CNP 변이체는 하나 이상의 변형된 아미노산을 포함하는데, 이것은 하나 이상의 다음 CNP 잔기(residue)에 대응하는 포지션에서의 변형된 펩티드 결합으로 귀결될 수 있다 (예를 들어, 펩티드 결합 동배체(isosteres)의 이용을 통하여): Gly1, Lys4, Gly5, Cys6, Phe7, Gly8, Leu9, Lys10, Leu11, Ile14, Gly15, Ser16, Met17, Gly19, Leu20 and Gly21; 및

[0022] (x) 및 (z)는 독립적으로 부존재하거나 나트륨이뇨 폴리펩티드(예를 들어, NPPC, ANP, BNP) 또는 비-나트륨이뇨 폴리펩티드, (예를 들어, 인간 혈청 알부민(human serum albumin(HSA), IgG, 등등), 로부터 유래된 아미노산 시퀀스일 수 있다.

[0023] 일 실시예에서, 상기 CNP 변이체는 포함한다: (1) CNP22의 포지션 6, 7 또는 8 (Cys6, Phe7 또는 Gly8)중 하나에 대응하는 아미노산 포지션에서의 변형, (2) 일부 또는 모든 아미노산의 포지션 1-5에서 선택적으로 결실(deletions), 삽입(additions) 및/또는 치환(substitutions) 및 (3) 포지션 6-22에 대응하는 포지션에서 선택적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6 ,7, 8, 9 또는 10까지 추가적인 변형 (결실, 삽입 및/또는 치환), 여기에 있어서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10는 보존적 치환 또는 본 발명에 기술되거나 당업계에 알려진 다른 치환일 수 있다.

[0024] 어떤 CNP 변이체에 있어서, 숫자에 의하여 특정한 아미노산 포지션 (예를 들어, CNP22의 포지션 7)을 언급하는 것은 CNP 변이체에서 포지션의 상기 숫자가 앞선 삽입 또는 결실에 의하여 바뀌었더라도, 대응하는 아미노산 포지션에 대하여 언급하는 것이다. 예를 들면, "포지션 7" 또는 "Phe7"이라 함은 첫 번째 5개의 아미노산이 결실된 CNP 변이체에 대응하는 포지션 2를 의미하는 것이다. 비슷하게, "포지션 7"이라 함은 하나의 아미노산이 N-말단에 첨가된 CNP 변이체에 대하여 대응하는 포지션 8을 의미하는 것이다.

[0025] 본 발명에서 개시된 일 구현예에 있어서, 상기 CNP 변이체는 CNP22의 6 및 22에 대응하는 포지션 사이에 공유결합을 통하여 고리화(cyclized)될 수 있다. 상기 공유 결합은 당업계에서 알려진 방법을 이용하여 형성된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 상기 펩티드의 N-말단 아미노산 또는 N-말단을 향한(이러한 목적으로 "말단"아미노산으로 언급함) 아미노산과 C-말단 아미노산 또는 C-말단을 향한 아미노산 간에 형성된 공유결합을 통하여 고리화될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 공유결합은 상기 2개의 말단 아미노산의 곁사슬 간 또는 CNP22의 6 및 22 포지션에 있는 아미노산 간에 형성된다. 다른 구현예에서, 상기 공유결합은 하나의 말단 아미노산의 곁사슬과 다른 말단 아미노산의 말단 그룹 사이에서 형성되거나, 또는 각각의 말단 아미노산의 말단 그룹 사이에서 형성된다. 예를 들면, 말단 아미노산 간에 있어서 또는 CNP22의 6 및 22에 대응하는 포지션에서 상기 아미노산 간에 있어서 공유결합을 형성된 공유결합은 머리꼬리 (head-to-tail) 간, 곁사슬 (side chain-to-side chain) 간, 곁사슬머리 (side chain-to-head) 간, 또는 곁사슬꼬리 (side chain-to-tail)간의 결합이 가능하다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명은 CNP의 기능은 유지하면서 (예를 들어, cGMP생산의 자극), NEP에 대한 감소된 결합력, NEP에 의한 절단에 대한 증가된 저항성 및/또는증가된 생체내 혈청 반감기를 가지는 CNP 변이체에 관한 것이다. NEP는 그것의 활성 부위 공동 (active site cavity)의 제한된 크기로 인하여, 약 3 kDa보다 작은 기질을 우선적으로 인식한다 (Oefner, J. Mol. Biol., 296: 341-349 (2000)). 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 전체 분자량이 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 4, 4.6, 5, 5.2, 5.8, 6, 6.4 또는 7 kDa의 범위를 가지도록 증가시키기 위하여, 예를 들어 약 0.6 내지 약 5 kDa에 이르는 아미노산, 친수성 또는 수용성 폴리머, 소수성 산(지방산을 포함하여), 및/또는 탄수화물의 추가에 의하여, 변형된다. 구체적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 약 2.6 kDa 내지 약 7 kDa사이의 분자량을 가지거나, 또는 약 2.8 kDa 내지 약 6 kDa사이의 분자량을 가지거나, 또는 약 2.8 kDa 내지 약 5.8 kDa사이의 분자량을 가진다. 어떤 구현예에서, 예를 들어 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 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 또는 그 이상의 범위로 상기 CNP 변이체의 총 분자량을 증가시키기 위하여, 최소 약 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 또는 1.8 kDa, 또는 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 또는 5 kDa에 이르기까지 추가된다. 몇몇 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP-22의 6-22 아미노산과 적어도 약 70%, 75%. 80%, 85%, 90%, 또는 95% 동일하거나 상동성을 가진다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 천연 또는 비천연의 다른 아미노산 또는 펩티드모방체(peptidomimetic)로의 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실되는 것을 포함한다. 보존적 및 비보존적 치환 또는 삽입이 어떤 포지션에서도 예상되는 반면, 변형의 도입은, 예를 들면 CNP 활성 또는 NPR-B 결합에 관련된 것으로 당업계에서 확인되었던 부위

(region)에서의 보존적 치환에 의하여, 시작될 수 있다. 그러나, 비보존적 치환이 과거 변형에 내성이 있는 것으로 나타난 부위에서 일어날 수 있다.

[0027] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는, Cys6과 Cys22사이에서 고리화된 온전한 부분, 약 1-40, 1-20, 5-40, 5-35, 10-35, 15-35, 5-31, 10-31 또는 15-31 개의아미노산을 포함하는 N-말단 및/또는 C-말단 꼬리를 가지는 CNP를 포함하고, CNP-폴리펩티드 및/또는 비-CNP(non-CNP) 폴리펩티드로부터 유래된 단편들이다. 일 실시예에서, 상기 CNP변이체는 약 2.8 kDa 내지 약 4, 4.6, 5, 5.2, 5.8, 6, 6.4 또는 7 kDa에 이르는 범위의 분자량을 가진다. 상기 CNP 변이체의 비제한적인 예는 야생형 CNP22 또는 인간 또는 다른 종 유래의 나트륨이뇨 펩티드 전구체 시퀀스 (예를 들어, ANP, BNP 또는 CNP); 치환, 추가 및/또는 결실 아미노산을 가지는 나트륨이뇨 펩티드 전구체 C(NPPC) 변이체 (예를 들어, 상기 CNP 변이체는 분자량이 약 2.8 kDa 및 5.8 kDa 사이값을 가지는 펩티드로 귀결되는 CNP-53의 절단체일 수 있다); 또는 예를 들면, 혈청 알부민 또는 IgG 단백질과 같은 다른 비-CNP 폴리펩티드 (예를 들어, 상기 CNP 변이체는 인간 또는 다른 종 유래의 혈청 알부민 또는 IgG의 단편을 함유한 CNP 키메라일 수 있다)로부터 유래된 N-말단 및/또는 C-말단 연장을 가지는 하나 이상의 아미노산이 치환된 (예를 들어, K4R 치환) CNP22를 포함한다.

[0028] 일 실시예에서, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa의 일반적으로 본 명세서에서 기술되는 범위가 특징인 총질량을 가지고, NEP 분해에 대한 증가된 저항성을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 다음의 식에 의하여 표현된다:

[0029] $(x)\text{-}Gly_1\text{-}Leu_2\text{-}Ser_3\text{-}(b)_4\text{-}Gly_5\text{-}Cys_6\text{-}Phe_7\text{-}Gly_8\text{-}Leu_9\text{-}(h)_{10}\text{-}Leu_{11}\text{-}Asp_{12}\text{-}Arg_{13}\text{-}Ile_{14}\text{-}Gly_{15}\text{-}Ser_{16}\text{-}Met_{17}\text{-}Ser_{18}\text{-}Gly_{19}\text{-}Leu_{20}\text{-}Gly_{21}\text{-}Cys_{22}\text{-}(z)$ (서열번호 6), 여기에 있어서:

[0030] (x)는 합성 또는 천연의 폴리머릭(polymeric) 그룹이거나, 또는 그들의 조합이며, 합성 폴리머릭 그룹의 비-제한적인 예시는 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol, PEG, 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide, PEO)라고도 불림)이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비-제한적인 예시는 1 내지 35개 아미노산을 함유하고 NPPC 또는 치환 및/또는 결실을 포함하는 그들의 변이체, ANP, BNP 또는 혈청 알부민, IgG, 히스티딘-리치 당단백질(glycoproteins), 피브로넥틴(fibronectin), 피브리노겐(fibrinogen), 아연 핑거 포함 폴리펩티드 (zinc finger-containing polypeptides), 오스테오크린 (osteocrin) 또는 피브로블라스트 성장인자 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)와 같은 다른 비-CNP (폴리) 펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스이고;

[0031] (z)는 부존재하거나 또는 합성 또는 천연 폴리머릭 그룹일 수 있거나, 또는 그들의 조합일 수 있는데, 여기에 있어서, 합성 폴리머릭 그룹의 비제한적 예시는 PEG이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비제한적 예시는 나트륨이뇨 폴리펩티드 (예를 들어, NPPC, CNP, ANP 또는 BNP) 또는 비-나트륨이뇨 폴리펩티드 (예를 들어, 혈청 알부민 또는 IgG)로부터 유래된 아미노산 시퀀스이고;

[0032] (b) 및 (h)는 독립적으로 그 포지션에서 각각 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환 또는 곁사슬 상에서 반응성의 1차 아민을 가지지 않는 어떤 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드모방체(peptidomimetic)로 대체될 수 있는데, 예컨대 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린 (citrulline, Cit), Gln, Glu 또는 Ser을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, (b)는 Arg이다. 다른 구현예에서, 증가된 NEP 저항성을 위하여, (b)는 Gly이 아니다. 또 다른 구현예에서, (h)는 Arg가 아니다.

[0033] NNPPC 또는 그들의 변이체으로부터 유래된 아미노산의 비제한적인 예시는 다음을 포함한다 :

[0034] Arg,

[0035] Glu-Arg,

[0036] Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (서열번호 7),

[0037] Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (서열번호 8),

[0038] Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (서열번호 9),

[0039] Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (서열번호 10),

[0040] Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (서열번호 11),

[0041] Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (서열번호 12),

[0042] Gly-Ala-Asn-Arg-Met (서열번호 13),

[0043] Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (서열번호 14),

[0044] Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (서열번호 15),

[0045] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala (서열번호 16),

[0046] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg (서열번호 17),

[0047] Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (서열번호 18),

[0048] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (서열번호 19),

[0049] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg, (서열번호 20)

[0050] 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 (서열번호 21), 및

[0051] 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 (서열번호 22).

[0052] 예를 들어 ANP, BNP, 혈청 알부민 및 IgG와 같은 비-CNP 폴리펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스의 비제한적인 예시는 다음을 포함한다:

[0053] Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (서열번호 23);

[0054] Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (서열번호 24);

[0055] Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (서열번호 25);

[0056] Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (서열번호 26);

[0057] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (서열번호 27);

[0058] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (서열번호 28);

[0059] Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (서열번호 29);

[0060] Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (서열번호 30);

[0061] Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (서열번호 31); 및

[0062] Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (서열번호 32).

[0063] 일 구현예에서, 상기 CNP22 또는 그들의 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단은 독립적으로 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 또는 40 개의 아미노산을 포함하는 아미노산 연장(extension)으로 컨쥬게이트될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 아미노산 연장은 NPPC, CNP53, ANP 또는 BNP로부터 유래된 것이다. 구체적인 구현예에서, 상기 아미노산 연장은 Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (서열번호 33)이다. 관련된 구현예에서, 이러한 15-아미노산 연장은 구조 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) (서열번호 34)의 CNP 변이체를 제공하기 위하여 N-말단에 추가된다.

[0064] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 전체 분자 크기를 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 4, 5, 6 또는 7 kDa로 증가시키기 위하여 친수성 폴리머 (예를 들어, PEG)를 N-말단 및/또는 C-말단에 컨쥬게이트시킨 wtCNP22 또는 그 변이체 (예를 들어, 삽입(들), 결실(들), 및/또는 K4R 치환과 같은 치환(들)을 가지는 것) (서열번호 35)을 포함한다. 상기 CNP 변이체는 선택적으로, N-말단 및/또는 C-말단에서 예를 들어, 아미노산, 탄수화물, 소수성산 및/또는 인지질을 포함하는 폴리머릭 그룹으로 추가로 컨쥬게이트되고, 비제한적인 예시가 1 내지 35 또는 5 내지 31 개의아미노산을 포함하는 N-말단 아미노산 연장이다. 일 실시예에서, 최소한 약 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 또는 1.8 kDa이상, 또는 약 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 또는 5 kDa 이하까지의 친수성 폴리머릭 (예를 들어, PEG) 모이어티가 wtCNP22 또는 그 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단으로 추가된다.

[0065] 여기에서 보이는 바와 같이, 약 0.6kDa 또는 그 이상의 친수성 또는 수용성 PEG (또는 PEO) 폴리머의 CNP22 또는 그의 변종에 대한 컨쥬게이션은 일반적으로 NEP 절단에 대한 저항성을 현저하게 증가시킨다. 그러나, PEG의 wtCNP22에 대한 추가는, 비록 0.6 kDa만큼 작을지라도, CNP 기능성을 감소시킬 수 있고 (예를 들어, cGMP의 신호 자극), 약 2 또는 3 kDa 보다 큰 PEG의 CNP22 또는 그의 변종에 대한 추가는 크기 의존적으로 CNP 기능의 활성을 감소시킬 수 있다. 그러나 CNP 기능성 (최소한 wtCNP22의 그것에 필적할만한)은, 약 0.6 kDa 내지 약 1.2 kDa, 또는 약 2 kDa까지 가능한, PEG (또는 PEO) 폴리머가, 생리 조건 하에서 양이온으로 하전될 수 있는 상대적으로 큰 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 아르기닌)이 CNP22의 Gly1에 대응되는 포지션 바로 앞에 위치하는 N-말단 아미노산 연장을 갖는 CNP 변이체에 접합될 때 유지된다. 예를 들어 GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), ER-CNP22 (서열번호 38), ER-CNP22(K4R) (서열번호 39), R-CNP22 (서열번호 40) 및 R-CNP22(K4R) (서열번호 41)를 들 수 있다.

[0066] 따라서, 일 구현예에서 PEG화된 CNP 변이체(PEGylated CNP variants)은 CNP22 또는 그의 변이체의 N-말단에서 (예를 들어, K4R 치환을 가지는) 최소한 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 아미노산을 포함하는 아미노산 연장을 포함하고, 여기에 있어서 상기 PEG 폴리머는 여기에서 일반적으로 기재된 범위, 예를 들어 NEP 절단에 대하여 증가된 저항성을 위하여 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa의 범위에 의하여 특징되어진 총질량이 되기 위해 아미노산-연장된 CNP 변이체의 N-말단으로 콘쥬게이션된다. 일 구현예에서, 향상된 CNP 기능성을 위하여, PEG화된, 아미노산-연장 CNP 변이체는 CNP22의 Gly1에 대응하는 포지션에 바로 앞에 있고 생리 조건하에서 양으로 하전될 가능성이 있는 최소한 하나의 비교적 거대한 천연의 또는 비천연의 아미노산을 포함한다. 구체적인 실시예에서, 페길화된 아미노산 연장된 CNP 변이체는 CNP22의 Gly1에 대응하는 포지션 바로 앞에 하나 이상의 아르기닌 잔기를 포함한다.

[0067] N-말단 및/또는 C-말단에서, 예를 들어 PEG (또는 PEO) 같은 친수성 또는 수용성 폴리머로 컨쥬게이트된 CNP 변이체 뿐만 아니라, 본 발명은 내부 부위에서 그러한 폴리머가 컨쥬게이트된 CNP 변이체를 포함한다. 본 명세서의 목적인 간결성을 위하여, PEG (또는 PEO)는 친수성 또는 수용성 폴리머의 대표적인 예시로서 사용될 것이다. CNP 변이체의 PEG화는 다양한 부위에서 가능하고, (1) 오직 N-말단에서 PEG화; (2) 오직 C-말단에서 PEG화; (3) 오직 내부 부위에서 PEG화 (예를 들어, Lys4); (4) N-말단 및 C-말단 모두에서 PEG화; (5) N-말단 및 내부 부위 모두에서 PEG화; 및 (6) C-말단 및 내부 부위 모두에서 PEG화 되는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. NEP 분해에 대하여 증가된 저항성 및 CNP 기능성의 유지를 위하여, 어떤 구현예에서 PEG화된 CNP 변이체의 총질량은 본 발명에서 일반적으로 기술되어진 범위에 의하여 특징되는데, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 4, 5, 6 또는 7 kDa이다. 구체적인 구현예에서, CNP17, CNP22, CNP37 (하기에서 정의됨) 또는 그의 변이체 (아미노산 추가, 치환 및/또는 결실을 포함하는)은 오직 N-말단에서만 PEG화된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 오직 내부 부위 (예를 들어, Lys4)에서만 PEG화된다. 또 다른 구현예에서, CNP 변이체는 N-말단 및 내부부위 (예, Lys4)에서 PEG화된다. 계속해서 다른 구현예에 있어서, 더 나은 기능성을 위하여 CNP 변이체는 고리화 도메인 (예를 들어, CNP22의 Cys6 내지 Cys22에 대응하는) 내의 부위 (예를 들어, Lys 10)에서 PEG화 되지 않는다. 내부 부위에서 PEG화 되는 것을 막기 위하여, Lys4 및/또는 Lys10은 곁사슬 상에서 반응성 있는, 예를 들어, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu 또는 시트룰린 (citrulline, Cit)과 같은, 1차 아미노 그룹을 포함하지 않는 천연 또는 비천연 아미노산 또는 펩티드모방체(peptidomimetic)로 치환될 수 있다. 구체적인 구현예에서, Lys4 및/또는 Lys10는 Arg로 대체된다. 다른 구현예에서, Lys10는 Arg로 대체되지 않는다.

[0068] 본 발명은 유형 (호모폴리머 또는 코폴리머; 무작위의, 교차되는 또는 블럭 코폴리머; 선형의 또는 가지가 달린; 단분산된(monodispersed) 또는 다분산된(polydispersed)); 결합 (예를 들어, 아마이드(amide), 이민(imine), 아민알(aminal), 알킬렌(alkylene) 또는 에스터 결합과 같은 가수분해 할 수 있거나 안정한 결합); 컨쥬게이션 부위 (예를 들어, N-말단 및/또는 C-말단, 바람직하게는 CNP의 고리화된 부위 (CNP22의 6-22 잔기에 대응하는)에 있어서 상기 잔기의 일부분이 아닌); 및 길이 (예를 들어, 약 0.2, 0.4 또는 0.6 kDa 내지 약 2, 3, 4 또는 5 kDa)에 있어서 달라질 수 있는 친수성 또는 수용성 폴리머 (예를 들어, PEG 분자)의 용도에 관한 것이다. 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 당업계에서 알려진 바와 같이, N-히드록시 숙신이미드 (N-hydroxy succinimide, NHS)계 또는 알데하이드-계 화합물 또는 다른 화합물을 이용하여 CNP 펩티드로 컨쥬게이트될 수 있다. 상기 CNP 변이체는 예를 들어, wtCNP-22 (2.2kDa), wtCNP22의 고리화된 부위 (잔기 6-22)만을 갖는 CNP-17, CNP22의 N-말단 및/또는 C-말단에서 아미노산 연장된 CNP 변이체, 또는 아미노산 치환, 추가 및/또는 결실된 변이체를 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), R-CNP22 (서열번호 40), R-CNP22(K4R) (서열번호 41), ER-CNP22 (서열번호 38) and ER-CNP22(K4R) (서열번호 39)을 들 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위, 예를 들어 약 2.6 kDa 또

는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa에 의하여 특징되는 총질량을 가지는 상기 PEG-CNP 변이체는 단분산되고(monodispersed), 선형의, NHS-또는 알데하이드계 화합물에 의하여 N-말단 및/또는 C-말단에서 컨쥬게이트된, PEG (또는 PEO)기, 또는 투암 (two-arm) 또는 쓰리암(three-arm)으로 가지치고, NHS계 화합물에 의하여 N-말단 및/또는 C-말단에서 컨쥬게이트된, PEG기를 포함한다. 본 발명은 감소된 신정화용으로 디자인된, 카르복실화(carboxylated), 황산화(sulfated) 및 인산화(phosphorylated) 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 음전하로 하전된 PEG-CNP 변이체를 더 포함한다.

[0069] 관련된 구현예에서, 본 발명은 NHS- 또는 화학식 $(CH_2CH_2O)n$ 의 알데하이드계 또는 NHS-계 PEG를 포함하는 PEG-CNP 컨쥬게이트를 포함하고, 여기에 있어서, n은 12 내지 50의 정수이고, PEG 폴리머는 약 2.5 kDa까지의 분자량을 가진다. 구체적인 구현예에서, n은 12 또는 24이다. 일 구현예에서, 상기 PEG 폴리머의 말단 하이드록실 그룹은 비반응성 기로 캡핑된다. 구체적인 구현예에서, 상기 캡핑 기(capping group)는 예를 들어, 메틸과 같은 저급 알킬 그룹과 같은, 알킬 그룹이다.

[0070] 추가적인 구현예에 있어서, 상기 PEG 폴리머 또는 그의 유도체(derivatives)는 약 0.4 kDa 내지 약 2.5 kDa 또는 약 0.6 kDa 내지 약 1.5 kDa 범위의 수평균 분자량(number-average molecular weight)을 가지는 폴리머를 가진다.

[0071] 추가적인 구현예에 있어서, 상기 wtCNP 또는 CNP 변이체 펩티드는 예를 들어, 비스포스포네이트(bisphosphonates), 탄화수소(carbohydrates), 소수성 산 (지방산을 포함하는) 또는 아미노산 시퀀스를 포함하는 모이어티(moiety)로 컨쥬게이트된다. 상기 아미노산 시퀀스는 뼈/연골 표적화에 있어서 유용한, 예를 들어 폴리Asp 또는 폴리Glu를 포함하거나, 또는, 예를 들어 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 시알로프로틴(sialoprotein) 등등의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은, 설명된 뼈-표적화 도메인 또는 그의 유도체와 함께 뼈 단백질로부터 유래될 수 있다. CNP22 또는 그의 변이체가 뼈- 또는 연골-표적화 모이어티에 부착된 본 명세서의 일 구현예에 있어서, 그러한 모이어티는 상기 변형된 CNP 펩티드를 뼈 성장판의 연골세포로 데리고 가는 것을 촉진하기 위하여 디자인되고, 여기에 있어서, 상기 펩티드는 연골세포 상에서 NPR-B와 결합할 수 있고 NPR-B를 활성화시킬 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명은 NEP를 포함하는 펩티다제(peptidases)에 의한 절단에 있어서 덜 민감한 펩티드 결합을 가지는 CNP 변이체를 제공한다. 본 발명은 엔도펩티다제 절단의 부위에서 최소한 하나의 변형된 잔기를 포함하는 CNP변이체를 포함한다.

[0072] 일 구현예에서, CNP의 NEP 절단 부위에서 Cys6-Phe7 펩티드 결합 (-C(=O)-NH-)은 다음의 펩티드 결합 동배체(isosteres) 중 어느 것으로 치환될 수 있다:

[0073] $-CH_2-NH-$,

[0074] -C(=O)-N(R)-, 여기에 있어서 상기 아미드 그룹은 다음의 R 그룹 중 어느 것으로 알킬화된다 : 메틸(methyl), 에틸(ethyl), (n-프로필)n-propyl, 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸(tert-butyl),

[0075] $-C(=O)-NH-CH_2-$,

[0076] $-CH_2-S-$,

[0077] $-CH_2-S(O)_{\xi}-$, n은 1 또는 2,

[0078] $-CH_2-CH_2-$,

[0079] -CH=CH-,

[0080] $-C(=O)-CH_2-$,

[0081] -CH(CN)-NH-,

[0082] $-CH(OH)-CH_2-$,

[0083] -O-C(=O)-NH-, 및

[0084] -NHC(=O)NH-.

[0085] 다른 구현예에서, Phe7은 그것의 거울상 이성질체 D-Phe로 치환된다. 또 다른 구현예에서 D-거울상이성질체는 wtCNP-22 내에서 하나 또는 그 이상의, 총 22에 이르는 포지션으로 도입된다. 추가적인 구현예에서, 3-아미노-2-페닐프로피오닉산 (3-amino-2-phenylpropionic acid)과 같은 베타 아미노산은 Phe7로 치환되고, 이것은 곁사슬의 길이가 감소되는 동안 백본(backbone)의 길이를 증가시킨다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 호모시스테인(homocysteine),페니실아민(penicillamine), 2-머캅토프로피오닉 산(2-mercaptopropionic acid) 및 3-머캅토프로피오닉 산(3-mercaptopropionic acid)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 Cys6 포지션에서, Cys 유사체(analogs)를 포함한다.

[0086] Cys6 및 Phe7 사이의 NEP-저항성 결합의 존재하에서조차, 다른 펩티드 결합, 예를 들어 Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17 및 Gly19-Leu20을 포함하는 NEP에 의하여 가수분해될 수 있다. 따라서, 본 발명은 CNP 유사체의 백본(backbone)의 다양한 위치에서 펩티드 결합 동배체를 포함하는 CNP 유사체를 포함한다. 일 구현예에서, CNP 유사체 또는 변이체는 하나 이상의 펩티다제 절단 부위의 변형을 포함한다. 추가적인 구현예에서 상기 변이체는 NEP 활성 부위에의 결합에 중요한 아미노산 잔기에서 치환된 CNP를 포함하고, 그렇게 함으로써 NEP 분해에 대한 저항성을 증가시킨다. Gly8, Gly15, Ser18, Gly19 및/또는 Gly21를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 하나 또는 그 이상의 NEP-결합 잔기는, 상기 NEP 활성 부위에 대한 친화도를 감소시키기 위하여 더 큰 사이즈의 천연 또는 비천연의 아미노산 잔기로 치환된다. 또 다른 구현예에서, Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 및 Leu20을 포함하지만 이에 제한되지 않는, NEP 인식에 필수적인 하나 또는 그 이상의 소수성 잔기는 NEP 결합력을 감소시키는 천연 또는 비천연 아미노산 및/또는 펩티드모방체(peptidomimetics)로 치환된다. 또 다른 구현예에서, CNP의 첫번째 5개의 아미노산 중 1 내지 5 아미노산은 삭제되거나 천연 또는 비천연 아미노산 또는 펩티드모방체로 치환될 수 있거나 또는 하나 또는 그 이상의 천연 또는 비천연 아미노산 또는 펩티드모방체가 CNP의 첫번째 5개의 아미노산 중 어떤 하나 또는 전체에 첨가될 수 있다. 추가적인 구현예에 있어서, NEP에 대한 증가된 저항성을 위하여 상기 CNP 변이체는 본 명세서에서 일반적으로 개시되어진, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa 범위에 의하여 특징되는 총질량을 가지고, 하기 식에 의하여 표현된다:

[0087] $(x)\text{-}Gly_1\text{-}Leu_2\text{-}Ser_3\text{-}(a)_4\text{-}Gly_5\text{-}(b)_6\text{-}(c)_7\text{-}(d)_8\text{-}(e)_9\text{-}(f)_{10}\text{-}(g)_{11}\text{-}Asp_{12}\text{-}Arg_{13}\text{-}(h)_{14}\text{-}Gly_{15}\text{-}Ser_{16}\text{-}(i)_{17}\text{-}Ser_{18}\text{-}Gly_{19}\text{-}(j)_{20}\text{-}Gly_{21}\text{-}Cys_{22}\text{-}(z)$ (서열번호 46), 여기에 있어서:

[0088] (x)는 부재하거나 또는 예를 들어 비스포스포네이트(bisphosphonates)와 같은 합성 뼈-표적화 화합물; 폴리Asp 및 폴리Glu 같은 뼈 또는 연골 표적화에 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 시알로프로틴(sialoprotein) 등등의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은 설명된 뼈-표적화 도메인을 갖는 뼈 단백질로부터 유래된 아미노산 시퀀스; 하전된 PEG 분자와 같은 신정화를 줄이는 폴리머릭 또는 비폴리머릭 분자; 및 폴리머 (PEG와 같은), 탄수화물, 소수성 산 (지방산을 포함하는) 및/또는 아미노산과 같은 것을 포함하는 연장으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있고, 여기에 있어서, 상기 아미노산 연장은 예를 들어 1 내지 31 또는 1 내지 35 또는 5 내지 35 또는 10 내지 35 또는 15 내지 35 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, NPPC, ANP, BNP, 혈청 알부민 또는 IgG 같은 다른 비-CNP (폴리)펩티드, 또는 치환, 추가 및/또는 결실을 가지는 상기 언급한 폴리펩티드의 변이체 또는 그의 조합으로부터 유래될 수 있다.

[0089] (z)는 부재하거나 또는 폴리Asp 및 폴리Glu 같은 뼈 또는 연골 표적화에 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 시알로프로틴(sialoprotein) 과 같은 뼈 단백질의 뼈 표적화 도메인으로부터 유래된 아미노산 시퀀스; 및 ANP 또는 BNP와 같은 비-CNP (폴리) 펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있고;

[0090] (a)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환 또는 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린(citrulline, Cit), Gln, Ser 또는 Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는 곁사슬에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체로 대체될 수 있다. 일 실시예에 있어서, (a)는 Arg이고;

[0091] (b)는 Cys 및 Cys-CH_2-NH와 같은 Cys6와 Phe7 사이의 펩티드 결합 동배체를 포함하는 그룹으로부터 선택되고;

[0092] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉 산(3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체로서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸(methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸(tert-butyl)인 유도체; 및 Phe 유사체로 상기 Phe 유사체의 벤젠고리의 하나 이상의 오쏘-(ortho-), 메타-(meta-) 및

/또는 파라-(para-) 포지션은 할로겐(halogen), 하이드록실(hydroxyl), 시아노(cyano), 직선형 또는 가지친 C_{1-6} 알킬, 직선형 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 직선형 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, 헤테로사이클릴(heterocyclyl), C_{6-14} 아릴(aryl) 및 헤테로아릴(heteroaryl) (예시는 티로신(tyrosine), 3-클로로페닐알라닌(3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌(2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌(3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸-페닐알라닌(2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴 그룹 (1- 및 2- 나프틸알라닌(naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않는) 또는 헤테로아릴 그룹(피리딜알라닌(pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않는)으로 치환될 수 있는 Phe 유사체로 구성된 군에서 선택되고;

[0093] (d)는 Gly, tert-부틸-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val 및 Asn으로 구성된 군에서 선택되고;

[0094] (e)는 Leu, Ser, Thr 및 N-Me-Leu와 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0095] (f)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존성 아미노산 치환 또는 예를 들면, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는 곁사슬 상에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는, 펩티드모방체 또는 천연 또는 비천연의 아미노산으로 대체될 수 있고, 일 구현예에서 (f)는 Arg가 아니고;

[0096] (g)는 Leu 및 예를 들면 N-Me-Leu와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0097] (h)는 Ile, tBu-Gly 및 예를 들면 N-Me-Ile와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0098] (i)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부티릭 산 (2-aminobutyric acid, Abu) 및 2-아미노-이소부티릭 산 (2-amino-isobutyric acid, Aib)으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0099] (j)는 Leu, 노르류신(norleucine, Nle), 호모류신(homoleucine, Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg 및 예를 들면 N-Me-Leu와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0100] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 및/또는 20 포지션에서 하나 또는 그 이상의 변형을 포함하고, 선택적으로 본 발명에서 개시된 다른 어떤 포지션에서의 변형을 포함할 수 있다.

[0101] CNP22 또는 그의 변이체가 소수성 산에 부착될 수 있는 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 CNP 펩티드는 하나 또는 그 이상의 소수성 산에 부착될 수 있다. 소수성 산의 비제한적인 예시는 직쇄 또는 가지친, 포화 또는 불포화된 C_5-C_{12} 카복실산(carboxylic acids) (예를 들어, 펜타노익산(pentanoic acid), 헵타노익산(heptanoic acid) 등등), 및 천연 지방산을 포함한다. 상기 소수성 산은 상기 N-말단, 상기 C-말단 및/또는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 곁사슬에 부착될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 소수성 산은 N-말단에 컨쥬게이트된다. 구현예에서, 무엇보다도 변형된 CNP 펩티드 및 혈청 알부민 간의 비특이적 반응을 촉진하기 위하여 CNP22 또는 그의 변이체의 소수성 산에 대한 컨쥬게이션이 디자인되는데, 그렇게 함으로써 상기 CNP 펩티드의 크기가 증가하고 NEP와 같은 프로테아제(protease)에 의한 절단으로부터 보호된다. 상기 소수성 산-컨쥬게이트 CNP 펩티드(hydrophobic acid-conjugated CNP peptide)와 알부민간의 상호작용은 너무 강력하지는 않도록 디자인되고, 따라서 상기 변형된 CNP 펩티드는 연골을 따라서 분산되어 뼈 성장판의 연골세포에 도달할 수 있고, NPR-B에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있다.

[0102] 추가적인 구현예에 있어서, 본 발명은 생체외 또는 생체내에서, 동일 농도의 wtCNP22(예를 들어, 1μM)하 생산되는 cGMP 수준을 최소한 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% 또는 150%로 자극하고, $(b)_6$, $(c)_7$ 및/또는 $(d)_8$ 포지션에서 최소한 하나의 변형된 아미노산을 포함하고 다음의 식으로 표현되는 CNP 변이체를 제공한다:

[0103] (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) (서열번호 47), 여기에 있어서:

[0104] (x)는 부존재하거나 또는 나트륨이뇨 폴리펩티드 (예를 들어, NPPC, CNP, ANP 또는 BNP) 또는 본 발명에서 개시한 비나트륨이뇨 폴리펩티드 (예를 들어, HSA, IgG, 골표적화 단백질(bone-targeting protein) 등등)로부터 유래된 1 내지 5개의 아미노산을 포함하는 펩티드 시퀀스 일 수 있고;

[0105] (z)는 본 명세서에서 기술한 것과 같이, 부재하거나 또는 비스포스포네이트(bisphosphonates)와 같은 합성 골표적화 화합물(synthetic bone-targeting compounds); 폴리Asp 및 폴리Glu와 같은 뼈/연골 표적화 도메인에서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin) 및 시알로프로테인(sialoprotein)의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은 골표적화 도메인 및 그의 유도체를 포함하는 뼈 단백질; 하전된 PEGs와 같은 신정화(renal clearance)를 감소시키는 분자; 및 NEP 매개 분해에 대한 CNP의 저항성을 증가하는 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있고;

[0106] (a)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환으로 또는 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린(citrulline, Cit), Gln, Ser 또는 Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 곁사슬에 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체로 대체될 수 있다. 일 실시예에 있어서, (a)는 Arg이고;

[0107] (b)는 Cys 또는 데스카복시 시스테인일 수 있거나, 또는 상기 $(b)_6$-$(c)_7$ 펩티드 결합 (-C(=O)-NH-)은 다음의 펩티드 동배체 중 하나로 대체될 수 있다:

[0108] $-CH_2-NH-$,

[0109] -C(=O)-N(R)-, 상기 아미드 그룹은 다음의 R 그룹 중 하나로 알킬화된다 : 메틸(methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸(tert-butyl),

[0110] $-C(=O)-NH-CH_2-$,

[0111] $-CH_2-S-$,

[0112] $-CH_2-S(O)_\xi-$, n은 1 또는 2이고,

[0113] $-CH_2-CH_2-$,

[0114] -CH=CH-,

[0115] $-C(=O)-CH_2-$,

[0116] -CH(CN)-NH-,

[0117] $-CH(OH)-CH_2-$,

[0118] -O-C(=O)-NH-, or

[0119] -NHC(=O)NH-;

[0120] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉 산(3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체 같은 Phe의 펩티드 결합 동배체로서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸(methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸(tert-butyl)인 동배체; 및 Phe 유사체로서 상기 Phe 유사체의 벤젠고리의 오쏘-(ortho-), 메타-(meta-) 및/또는 파라-(para-) 포지션이 할로겐(halogen), 하이드록실(hydroxyl), 시아노(cyano), 직선형 또는 가지친 C_{1-6} 알킬, 직선형 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 직선형 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, 헤테로사이클릴(heterocyclyl), C_{6-14} 아릴(aryl) 및 헤테로아릴(heteroaryl) (예시는 티로신(tyrosine), 3-클로로페닐알라닌(3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌(2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌(3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸-페닐알라닌(2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴 그룹 (1- 및 2- 나프틸알라닌(naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않는) 또는 헤테로아릴 그룹(피리딜알라닌(pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않는, Phe 유사체로 치환될 수 있는,로 구성된 군에서 선택되고;

[0121] (d)는 Gly, tert-부틸-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr 및 Asn으로 구성된 군에서 선택되고;

[0122] (e)는 Leu, Ser, Thr 및 N-Me-Leu와 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0123] (f)는 곁사슬 상에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는, 예를 들면, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 펩티드모방체 또는 천연 또는 비천연의 아미노산으로 대체될 수 있고, 일 구현예에서 (f)는 Arg가 아니고;

[0124] (g)는 Leu 및 예를 들면 N-Me-Leu와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0125] (h)는 Ile, tBu-Gly 및 예를 들면 N-Me-Ile와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0126] (i)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부티릭 산 (2-aminobutyric acid, Abu) 및 2-아미노-이소부티릭 산 (2-amino-isobutyric acid, Aib)으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0127] (j)는 Leu, 노르류신(norleucine, Nle), 호모류신(homoleucine, Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg 및 예를 들면 N-Me-Leu와 같은, 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0128] 추가적인 구현예에 있어서, 본 발명은 생체외 또는 생체내에서, 동일 농도의 wtCNP22(예를 들어, 1μM)하 생산되는 cGMP 수준을 최소한 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% 또는 150%로 자극하고, NEP 분해에 대하여 증가된 저항성을 위하여 본 명세서에서 일반적으로 기재된, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa 범위에 의하여 특징되는 총질량을 가지고 다음의 일반적인 구조로 표현되는 CNP 변이체를 제공한다:

[0129] (x)-(y)-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) (서열번호 48), 여기에 있어서:

[0130] (x)는 합성 또는 천연 폴리머릭 그룹(polymeric group), 또는 그들의 조합이며, 여기에 있어서, 합성 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol, PEG)이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 1 내지 35개의 아미노산을 포함하고 NPPC 또는 치환 및/또는 결실된 그의 변이체, ANP, BNP 또는 혈청 알부민, IgG, 히스티딘-리치 당단백질(histidine-rich glycoproteins), 피브로넥틴(fibronectin), 피브리노겐(fibrinogen), 아연-핑거 포함 폴리펩티드(zinc finger-containing polypeptides), 오스테오크린(osteocrin) 또는 피브로블라스트 성장인자 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)와 같은 다른 비CNP (폴리)펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스이고;

[0131] (y)는 부재하거나, 또는 Gly_1-Leu_2-Ser_3-Lys_4-Gly_5 (CNP22의 1 내지 5 포지션에 대응하는) (서열번호 1) 및/또는 천연 또는 비천연의 아미노산을 이용하여 상기 포지션 중 하나 또는 그 이상 포지션에서의 그 치환체 유래의 하나 또는 그 이상의 아미노산일 수 있고 (예를 들어, K4R 치환제);

[0132] (h)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환 또는 곁사슬 상에서 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트루린 (citrulline, Cit), Gln, Glu 또는 Ser을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 어떤 펩티드모방체(peptidomimetic) 또는 천연 또는 비천연의 아미노산으로 대체될 수 있는데, 일 구현예에서, (h)는 Arg가 아니고; 및

[0133] (z)는 부재하거나 또는 합성 또는 천연 폴리머릭 (polymeric group), 또는 그들의 조합이며, 여기에 있어서, 합성 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 PEG이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 나트륨이뇨 폴리펩티드(NPPC, CNP, ANP 또는 BNP) 또는 비나트륨이뇨 폴리펩티드(혈청 알부민 또는 IgG)로부터 유래된 아미노산 시퀀스이다.

[0134] 일 구현예에서, (x), (y) 및 (z)는 함께 약 10 내지 약 40개, 또는 약 15 내지 약 35개의 아미노산을 포함한다. 다른 구현예에서, (x)는 1 내지 40개의 아미노산을 포함하는 아미노산 시퀀스이거나, 1내지 20개의 아미노산을 포함하는 아미노산 시퀀스이다.

[0135] 생체외 또는 생체내에서, 동일 농도의 wtCNP22와 (예를 들어, 1μM)하 생산되는 cGMP 수준을 최소한 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% 또는 150%으로 자극하는 CNP 변이체가 추가적으로 고려되고, 하기 시퀀스를 포함한다:

[0136] (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} (서열번호 138), 여기에 있어서:

[0137] (y)는 Gly_1-Leu_2-Ser_3-Lys_4-Gly_5 (서열번호 1) 및/또는 하나 또는 그 이상의 상기 포지션에서의 천연 또는 비천연의 아미노산을 이용한 치환체(예를 들어, K4R 치환)로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하고, 나아가 약 0.6 kDa 내지 약 5 kDa의 분자량을 가지는 친수성 또는 수용성 폴리머를 포함한다. 구현예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 상기 아미노산-연장 CNP 변이체의 N-말단으로 컨쥬게이트된다. 구체적인 구현예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 PEG (또는 PEO)이다.

[0138] 다른 구현예에서, 본 발명은 생체외 또는 생체내에서, 동일한 농도의wtCNP22 (예를 들어, 1μM)하 생산되는 cGMP 수준을 최소한 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% or 150%으로 자극하는 CNP 변이체를 제공하고, 여기에 있어서 상기 CNP 변이체는 1 내지 15개의 아미노산을 포함하는 N-말단 및/또는 C-말단 펩티드 연장을 포함하고, 친수성 또는 수용성 폴리머로 컨쥬게이트된다. 구현예에서, 상기 펩티드 연장은 5 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 구체적인 구현예에 있어서, 상기 펩티드 연장은 5개의 아미노산을 포함한다. 또 다른 구체적인 구현예에 있어서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 PEG (또는 PEO)이다.

[0139] 다른 추가적 구현예에서, 본 발명의 상기 CNP 변이체는 생체외 또는 생체내에서, 동일 농도의 wtCNP22 (예를 들어, 1μM)하 생산되는 cGMP 수준을 최소한 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140% or 150%으로 자극하는 CNP 변이체를 제공하고, 나트륨이뇨 펩티드 전구체 C(natriuretic peptide precursor C, NPPC)로부터 유래된 최소한 15개의 아미노산 단편을 포함하고, 여기에 있어서, 상기 단편은 동일한 수의 아미노산 잔기를 포함하는 야생형 NPPC의 시퀀스와 최소한 70%의 상동성(homologous)을 가진다.

[0140] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 NEP 저항성을 증가시키기 위하여 본 명세서에서 일반적으로 기재된, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa 범위에 의하여 특징되는 총질량을 가지고, 다음의 구조로 표현된다:

[0141] (x)-$(b)_6$-$(c)_7$-$(d)_8$-$(e)_9$-$(f)_{10}$-$(g)_{11}$-Asp_{12}-Arg_{13}-$(h)_{14}$-Gly_{15}-Ser_{16}-$(i)_{17}$-Ser_{18}-Gly_{19}-$(j)_{20}$-Gly_{21}-Cys_{22}-(z) (서열번호 49), 여기에 있어서:

[0142] (x)는 부존재하거나 (즉, N-말단의 끝이 $-NH_2$ 그룹으로 끝남) 상기 펩티드 Gly_1-Leu_2-Ser_3-Lys_4-Gly_5 (서열번호 1) 로부터 유래된 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산의 시퀀스; 폴리Asp 및 폴리Glu 같은 뼈 또는 연골 표적화에 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 시알로프로틴(sialoprotein) 등등의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은 설명된 뼈-표적화 도메인; 하전된 PEG 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 친수성 또는 수용성 폴리머 같은 신정화를 감소시키는 분자; 및 PEG, 카복시레이트(carbohydrates), 소수성 산(hydrophobic acids), 아미노산 (amino acids) 또는 그들의 조합을 포함하는 모이어티로서, 여기에 있어서 상기 모이어티는 NPPC 또는, BNP, ANP, 혈청 알부민 또는 IgG 같은 비-CNP (폴리)펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 아미노산 연장일 수 있는 모이어티로 구성된 군에서 선택될 수 있고;

[0143] (z)는 부존재하거나 또는 폴리Asp 및 폴리Glu와 같은 뼈/연골 표적화 도메인에서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin) 및 시알로프로테인(sialoprotein)과 같은 골표적화 단백질로부터 유래된 아미노산 시퀀스; 및 본 발명에서 기재된, NPPC 또는 비CNP (폴리)펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스로 구성된 군에서 선택될 수 있고;

[0144] (b)는 Cys 및 Cys-CH_2-NH와 같은 Cys6 및 Phe7간의 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0145] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉산 (3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체 (N-alkylated derivatives of Phe) 로서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸 (methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸 (tert-butyl)인 유도체이고; 및 Phe 유사체로서, 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리에서 하나 또는 그 이상의 오쏘- (ortho-), 메타- (meta-), 및/또는 파라- (para-) 포지션은 할로겐 (halogen), 하이드록실 (hydroxyl), 시아노 (cyano), 가지없는 또는 가지 친 C_{1-6} 알킬, 가지없는 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 가지없는 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 (티로신 (tyrosine), 3-클로로페닐알라닌 (3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌 (2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌 (3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸 페닐알라닌 (2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는)로 구성된 군에

서 선택되는 하나 또는 그 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴 그룹(1- 및 2-나프틸알라닌(2-naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 헤테로 아릴그룹(피리딜알라닌 (pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine))으로 치환되는, Phe 유사체로 구성된 군에서 선택되고;

[0146] (d)는 Gly, tert-부틸-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr 및 Asn로 구성된 군에서 선택되고;

[0147] (e)는 Leu, Ser, Thr, 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0148] (f)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나, 또는 보존성 아미노산 치환 또는 곁사슬 상에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는, 예를 들면, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드모방체로 대체될 수 있고, 일 구현예에서 (f)는 Arg가 아니고;

[0149] (g)는 Leu 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0150] (h)는 Ile, tBu-Gly 및 N-Me-Ile 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0151] (i)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부티릭산 (2-aminobutyric acid , Abu) 및 2-아미노-이소부티릭산 (2-amino-isobutyric acid, Aib)으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0152] (j)는 Leu, 노르류신 (norleucine, Nle), 호모류신 (homoleucine, Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0153] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 NEP 저항성을 증가하기 위하여, 본 명세서에서 일반적으로 기술한 범위에 의하여, 예를 들면 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa의, 총질량 범위로 특징되고, 다음 식으로 표현된다:

[0154] (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) (서열번호 50), 여기에 있어서:

[0155] (x) 및 (z)는 독립적으로 부재하거나 또는 비스포스포네이트(bisphosphonates)와 같은 합성 골표적화 화합물(synthetic bone-targeting compounds); 폴리Asp 및 폴리Glu와 같은 뼈/연골 표적화 도메인에서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin) 및 시알로프로테인(sialoprotein)의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은 골표적화 도메인 및 그의 유도체를 포함하는 뼈 단백질; 하전된 PEG 분자와 같이 친수성 또는 수용성 폴리머를 포함하지만 이에 제한되지 않는 신정화(renal clearance)를 감소하는 모이어티; 및 친수성 폴리머 (예를 들어, PEG), 탄수화물, 소수성 산 및/또는 아미노산을 포함하는 모이어티 로 구성된 군에서 선택될 수 있고;

[0156] (a)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환으로 또는 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린(citrulline, Cit), Gln, Ser 또는 Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 곁사슬에 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체로 대체될 수 있다. 일 실시예에 있어서, (a)는 Arg이고;

[0157] (b)는 Cys 및 Cys-CH_2-NH와 같은 Cys6 및 Phe7간의 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0158] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉산 (3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체(N-alkylated derivatives of Phe), 여기에 있어서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸 (methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸 (tert-butyl)이고; 및 Phe 유사체, 여기에 있어서, 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리에서 하나 또는 그 이상의 오쏘- (ortho-), 메타- (meta-), 및/또는 파라- (para-) 포지션은 할로겐 (halogen), 하이드록실 (hydroxyl), 시아노 (cyano), 가지없는 또는 가지 친 C_{1-6} 알킬alkyl, 가지없는 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 가지없는 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 (티로신 (tyrosine), 3-클로로페닐알라닌 (3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌 (2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌 (3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸 페닐알라닌 (2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는)로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴

그룹(1- 및 2-나프틸알라닌(2-naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 헤테로 아릴그룹(피리딜알라닌 (pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine))으로 치환되는, Phe 유사체로 구성된 군에서 선택되고;

[0159] (d)는 Gly, tert-butyl-Gly, Thr, Ser, Val 및 Asn로 구성된 군에서 선택되고;

[0160] (e)는 Leu, Ser, Thr, 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0161] (f)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나, 또는 보존성 아미노산 치환 또는 곁사슬 상에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는, 예를 들면, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 펩티드모방체 또는 천연 또는 비천연의 아미노산로 대체될 수 있고, 일 구현예에서 (f)는 Arg가 아니고;

[0162] (g)는 Leu, Asn 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0163] (h)는 Ile, tert-부틸-Gly (tBu-Gly), Asn 및 N-Me-Ile 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0164] (i)는 Gly, Arg, Ser 및 Asn으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0165] (j)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부티릭 산 (2-aminobutyric acid , Abu) 및 2-아미노-이소부티릭 산 (2-amino-isobutyric acid, Aib)으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0166] (k)는 Leu, 노르류신 (norleucine, Nle), 호모류신 (homoleucine, Hleu), Val, tert-부틸-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0167] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22의 1 내지 22 포지션 중 하나 또는 그 이상의 포지션에서 아미노산 치환체(들)를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, Gly1은 Arg 또는 Glu으로 치환된다. 다른 구현예에서, Lys4는 Arg으로 대체된다. 다른 구현예에서, Gly5는 Arg, Gln 또는 Ser으로 치환된다. 또 다른 구현예에서, Gly15는 Ser, Asn, Arg 또는 Cit으로 치환된다. 추가적인 구현예에서, Gly19는 Ser, Arg 또는 Asn으로 치환된다. 또 다른 구현예에서, Gly21는 Ser, Thr, 또는 Arg으로 치환된다.

[0168] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 GLSKGC(CH_2NH)FGLKLDRIGSMSGLGC (formed using descarboxy-Cys) (서열번호 56), GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 57), GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC(서열번호 136), GLSKGCF-(tBuG)-LKLDRIGSMSGLGC (서열번호 58), GLSKGC-(3-Cl-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 137), 및 GLSKGC-[$NHCH_2CH$(Ph)CO]-GLKLDRIGSMSGLGC (3-아미노-2-페닐프로피오닉 산 (3-amino-2-phenylpropionic acid)를 이용하여 형성되는) (서열번호 59)으로 구성된 군에서 선택된다. 추가적인 구현예에서, 이황화 결합은 Cys 6, 데스카복시-Cys (descarboxy-Cys) 또는 Cys 포지션에서 다른 설프히드릴-포함 시스테인 유사체, 및 본 명세서에서 개시된 다른 CNP 변이체의 Cys22 사이에 존재한다.

[0169] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22 또는 CNP17의 N-말단 및/또는 C-말단에서 아미노산 연장을 포함하는데, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 :

[0170] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-53**) (서열번호 4);

[0171] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-37**, **Analog BL**) (서열번호 60);

[0172] AAWARLLQEHPNAGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CA**) (서열번호 61);

[0173] AAWARLLQEHPNARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CB**) (서열번호 62);

[0174] DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CC**) (서열번호 63);

[0175] RGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 40);

[0176] ERGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 38);

[0177] GANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 64);

[0178] GANRRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 65);

[0179] GANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 66);

[0180] GANSSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 67);

[0181] GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 144) (실시예 및 도면에서 때때로 "CNP27-HSA" or "HSA-CNP27"으로 지정됨);

[0182] SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (**Analog CD**) (서열번호 68) (BNP 유래 N-말단 및 C-말단 꼬리를 가지는 CNP17).

[0183] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22의 4 포지션에서 K4R 치환을 가진다. CNP(K4R) 변이체의 제한되지 않는 예시는 다음을 포함한다:

[0184] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog AY**) ((서열번호 36);

[0185] GANPRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CI**) (서열번호 37);

[0186] RGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog AZ**) (서열번호 41);

[0187] ERGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog BA**) (서열번호 39);

[0188] GANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CH**) (서열번호 69);및

[0189] GANSSGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CG**) (서열번호 70).

[0190] 일 구현예에서, N-말단에서 PEG (또는 PEO) 모이어티 및 아미노산 연장을 가지는 CNP 변이체는 CNP22의 Gly1에 대응하는 상기 포지션 바로 앞의 포지션에서 아르기닌 (arginine)을 포함한다. 상기 PEGylated CNP 변이체는 NEP 분해에 대하여 증가된 저항성, 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력 및 CNP 기능성을 향상 (예를 들어, cGMP 신호의 활성화)시키기 위하여 디자인된다. PEGylated CNP 변이체의 비제한적인 예시는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), PEO24-GANRR-CNP22(서열번호 65), PEO12-GANRR-CNP22(서열번호 65), PEO24-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), PEO12-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), PEO24-GANPR-CNP22(서열번호 37), PEO12-GANPR-CNP22(서열번호 66), PEO24-GANQQ-CNP22(서열번호 64), PEO12-GANQQ-CNP22(서열번호 64), PEO24-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39), PEO12-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39), PEO24-ER-CNP22 (서열번호 38), PEO12-ER-CNP22 (서열번호 38), PEO24-R-CNP22(K4R) (서열번호 41), PEO12-R-CNP22(K4R) (서열번호 41), PEO24-R-CNP22(서열번호 40), 및 PEO12-R-CNP22(서열번호 40)을 포함하고, 여기에 있어서 PEO24는 단순분산된 (monodispersed) 1.2 kDa PEG 폴리머이고 PEO12는 단순분산된(monodispersed) 0.6 kDa PEG 폴리머이다. 일 구현예에서, 상기 PEG (또는 PEO) 폴리머는 CNP 변이체의 N-말단으로 부착된다.

[0191] 추가적인 CNP 변이체는 생체 내에서 퓨린 프로테아제에 대한 저항성을 향상시키도록 디자인된, 퓨린 절단 부위 (밑줄)에서 돌연변이를 가지고, 및/또는 파이로글루타민 생성을 예방하기 위하여 디자인된, 글루타민에 선행하는 글라이신 (밑줄)을 가지는 CNP 37의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는며, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 :

[0192] GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CS**) (서열번호 71);

[0193] GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CT**) (서열번호 72);

[0194] GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CU**) (서열번호 73);

[0195] GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**An. CW**) (서열번호 74);

[0196] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP37, **An. DB**) (서열번호 75);

[0197] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP37) (서열번호 145).

[0198] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22 및 N-말단 펩티드 단편을 포함하는 키메라이고, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 :

[0199] GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CQ**) (히스티딘 리치 당단백질 (HRGP) 단편-CNP22 키메라) (서열번호 76);

[0200] GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CR**) (HRGP 단편-CNP22 키메라) (서열번호 77);

[0201] GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CX**) (HRGP 단편-CNP22 키메라) (서열번호 78);

[0202] GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CF**) ($IgG_1(F_\gamma)$ 단편-CNP22 키메라) (서열번호 79);

[0203] GQHKDDNPNLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CY**) (인간 세럼 알부민 (HSA) 단편-CNP22 키메라) (서열번

호 80);

[0204] GERAFKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CE**) (HSA 단편-CNP22 키메라) (서열번호 81);

[0205] FGIPMDRIGRNPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CZ**) (오스테오크린 "NPR C 저해제" 단편-CNP22 키메라) (서열번호 82); 및

[0206] GKRTGQYKLGSKTGPGPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog DA**) (FGF2 "헤파린-결합 도메인" 단편 -CNP22 키메라) (서열번호 83).

[0207] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 N-말단 펩티드 단편 및 아르기닌이 CNP22의 Lys4 대신에 CNP22를 포함하는 키메라이고 ("CNP22(K4R)"), 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 :

[0208] GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CK**) ($IgG_1(F_\gamma)$ 단편 -CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 84);

[0209] GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CL**) (HSA 단편-CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 85)

[0210] GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CM**) (피브로넥틴 단편 -CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 86);

[0211] GQTHSSGTQSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CN**) (피브로넥틴 단편-CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 87);

[0212] GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CO**) (피브로넥틴 단편-CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 88); 및

[0213] GSSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**Analog CP**) (아연 핑거 단편 -CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 89)

[0214] 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP 펩티드 또는 변이체, 및 절단 가능한 펩티드 또는 단백질 또는 펩티드 태그를 포함하는 키메라 (chimera) 또는 융합 단백질이다. 예시적인 절단 가능한 단백질 또는 펩티드는 히스티딘 (histidine (예를 들어., hexa-His) 태그; TAF12: 인간 전사 인자 TAF12 (human transcription factor TAF12); KSI: 케토스테로이드 이소머라제 (ketosteroid isomerase); MBP: 말토즈-결합 단백질 (maltose-binding protein); β-Gal:β-갈락토시다제 (β-galactosidase); GST: 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (glutathione-S-transferase); Trx: 티오레독신 (thioredoxin); CBD: 키틴 결합 도메인 (chitin binding domain); BMPM: BMP-2 돌연변이, SUMO, CAT, TrpE, 스타피로코컬 단백질 A, 스트랩토코컬 단백질, 녹말-결합 단백질, 엔도글루카나제 A (endoglucanase A)의 셀룰로오스 결합 도메인, 엑소글루카나제 Cex (exoglucanase Cex)의 셀룰로오스 결합 도메인, 비오틴-결합 도메인 (biotin-binding domain), recA, Flag, c-Myc, 폴리(His), 폴리(Arg), 폴리(Asp), 폴리(Gln), 폴리(Phe), 폴리(Cys), 녹색 형광 단백질 (green fluorescent protein), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein), 황색 형광 단백질 (yellow fluorescent protein), 청색 형광 단백질 (cyan fluorescent protein), 비오틴 (biotin), 아비딘 (avidin), 스트렙타비딘 (streptavidin), 항체 에피토프 (antibody epitopes) 및 그의 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0215] 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 모노머 (monomer) 또는 다이머 (dimer)일 수 있다. 관련된 구현예에서, 다이머릭 CNP 변이체 (dimeric CNP variants)의 모노머는 링커 (linker)를 통하여 또는 링커 없이 N-말단에서 N-말단으로, 링커를 통하여 또는 링커 없이 N-말단에서 C-말단으로, 또는 링커를 통하여 또는 링커 없이 C-말단에서 C-말단으로 부착될 수 있다.

[0216] IgG 단편 및 CNP22 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라 (chimera)는, 무엇보다도, NEP 분해에 대한 증가된 저항성 및 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력을 위하여 디자인된다. HSA의 표면 단편을 포함하는 CNP 키메라는, 무엇보다도, 감소된 면역원성 (immunogenicity) 및 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력을 위하여 디자인된다. N-말단에서 양전하의, 히스티딘-리치 (histidine-rich), 비-리신 (non-lysine), 비-아르기닌 (non-arginine) 시퀀스를 포함하는 HRGP-CNP22 및 HRGP-CNP22(K4R) 키메라는, 무엇보다도, 프로테아제에 대한 증가된 안정성을 보이도록 디자인된다. 오스테오크린 (osteocrin) 단편을 포함하는 키메라는, 프로테아제 **절단** (예를 들어, 퓨린 (furin))시, 뼈 성장판에서 오스테오크린 단편을 방출하기 위하여 디자인되는데, 상기 단편은 제거 수용체 NPR-C를 저해할 수 있다. FGF2 헤파린 결합 단편 (FGF2 heparin-binding fragment)을 포함하는 키메라에 대하여, 상기 단편이 결합된 헤파린은 키메라를 분해로부터 보호하여, 더 길어진 혈청 반감기를 제공하기 위하여 디자인된다. 피브로넥틴(fibronectin), 피브리노겐(fibrinogen) 또는 아연 핑거 단편 (zinc-finger fragment)을 포함하는 키메라는 다른 장점 중에서, 혈청 알부민의 결합을 줄이기 위하여 디자인된다.

[0217] 이론에 의하여 얽매이지 않고, 약 2.6KDa 또는 2.8kDa 내지6 또는 7kDa의 분자량을 가지는 CNP 변이체는 NEP 분해에 대한 저항성이 증가되었고 wtCNP22와 비교하였을 때, 비슷하거나 증가된 기능성을 (NPR-B에 결합하여 cGMP 신호를 자극) 보였으며, 만약 혈청 알부민과 같은 혈장 단백질 (plasma proteins)에 단단히 결합하지 않는다면

더욱 효과적일 수 있다. 혈장 단백질 (예를 들어, 혈청 알부민)에 타이트하게 결합하지 않는 CNP 변이체는 더욱 효과적으로 연골을 따라서 분산되고, 뼈 성장판의 연골 세포에 도달하여 cGMP 신호를 위하여 결합하고 활성화될 수 있다. 일 구현예에서, 혈장 단백질 (예를 들어, 혈청 알부민)에 대하여 감소된 결합력을 가지는 CNP 변이체는 CNP22 또는 그의 변이체 및 IgG의 펩티드 단편을 포함하는 키메라이다. 다른 구현예에서, 혈장 단백질에 대하여 감소된 결합력을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 CNP22 또는 CNP22(K4R) 및 폴리펩티드 유래의 단편을 포함하는 키메라이다 (예를 들어, IgG, HSA, 피브로넥틴 (fibronectin), 피브리노겐 (fibrinogen),아연 핑거 포함 폴리펩티드 (a zinc finger-containing polypeptide) 등등). 다른 구현예에서, 혈장 단백질에 대하여 감소된 결합력을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 CNP22 또는 친수성 또는 수용성 폴리머로 컨쥬게이트된 그의 단편을 포함한다. 일 실시예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 PEG (또는 PEO)이다. 다른 구현예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머 (예를 들어, PEG)는 생리적인 조건 하에서 음전하를 폴리머로 전달하는 하나 또는 그 이상의 작용기, 예를 들어, 카복실 (carboxyl), 설페이트 (sulfate) 또는 포스페이트 (phosphate)기, 또는 그들의 조합과 함께 기능성화 된다.

[0218] 본 명세서에서 개시한 구현예에 있어서, 상기 CNP 변이체는 실질적으로 야생형 CNP22와 동일하거나 CNP22보다 더 나은 생물학적 활성을 가질 수 있다. 예를 들면, 상기 CNP 변이체는 야생형 CNP22의 활성에 있어서 최소한 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상을 유지할 수 있거나, 또는 야생형 CNP22의 활성 이상의 활성을 유지하거나 또는 예를 들어서 cGMP의 생산을 자극하기 위하여 NPR-B (GC-B)와의 상호작용에 대하여 CNP22보다 더 큰 활성을 가질 수 있다. 아니면, 추가적으로 상기 CNP 변이체는 연골세포 증식, 연골세포 분화, 미토겐 활성화된 단백질 키나제 (mitogen activated protein (MAP) kinase)/ MEK (Raf-1) 키나아제 신호 경로의 저해 및 연골 내골화 (endochondral ossification)의 촉진을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 연골 내 뼈 성장 및 연골세포 활성에 대하여, 야생형 CNP22 활성의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 유지할 수 있거나, 또는 CNP22보다 더 큰 활성을 가질 수 있다. 본 명세서에서 개시된 다른 구현예에 있어서, 상기 CNP 변이체는 야생형 CNP22의 6-22 아미노산 또는 1-22 아미노산과 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 동일하거나 상동성을 가지는 아미노산 시퀀스를 포함할 수 있다.

[0219] 추가적인 구현예에 있어서, 본 발명은 NPR-B에 결합 및 NPR-B를 활성화하는 능력을 유지하면서 NPR-C 제거 수용체 (NPR-C clearance receptor)에 대하여 더 적은 친화도를 가지는 CNP22의 변이체를 포함한다. 본 발명은 상세한 설명에 기재한 바와 같이, NPR-B/CNP의 상동성-기반 구조 모델 (homology-based structural model)로부터 생성되었던 것이거나, 또는 생성될 수 있는 변이체에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 구조적인 가용성을 감소시키기 위하여, 1, 5, 8, 15, 19 및 21 포지션의 하나 또는 그 이상의 Gly 부위에서 치환체(들)를 가지고, 이것은 NPR-C 이상의 NPR-B 결합 특이성을 증가시킬 수 있다. NPR-C에 대하여 감소된 결합력을 가질 수 있는 가능성이 있는 CNP의 변이체는 다음 치환체 중 하나 또는 그 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 : 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 및 G21R.

[0220] 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 및 21포지션 중 하나 또는 그 이상에서 변형 및/또는 치환을 가질 수 있고, 본 명세서에서 개시된 다른 어떤 포지션에서 선택적으로 변형 및/또는 치환되는 것을 가질 수 있다. 추가적인 구현예에서, 상기 변이체는 뼈/연골 표적화의 촉진, 신정화의 감소, 및/또는 NEP 분해에 대한 저항성 증가를 위하여, 예컨대 N- 및/또는 C-말단에서 컨쥬게이션(들) (conjugation(s))또는 연장(들) (extension(s))이 선택적으로 일어날 수 있다. 상기 컨쥬게이션(들) 또는 연장(들)은 예를 들면 폴리Asp, 폴리Glu, 뼈- (bone-) 또는 연골-표적화 펩티드 (cartilage-targeting peptides), 오스테오폰틴 (osteopontin), 오스테오칼신 (osteocalcin), 시알로프로틴 (sialoprotein), PEGs, 탄수화물 (carbohydrates), 소수성산 (hydrophobic acids), NPPC 또는 비-CNP (폴리)펩티드, 또는 그들의 조합으로부터 형성 또는 유래된 분자 또는 시퀀스를 포함한다.

[0221] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 적절하게 치환 및/또는 추가되는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체를 이용하여 일반적인 고상 펩티드 합성법 (solid-phase peptide synthesis methods)으로 준비된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는, 예를 들면, 태그 또는 캐리어 단백질을 포함하는 융합 단백질을 통하여, 재조합 합성 공정 (recombinant synthesis processes)에 의하여 생산되는데, 여기에 있어서, 태그 또는 캐리어 단백질의 이용은, 예를 들면, 상기 융합 단백질의 탐지 (detection), 분리 (isolation) 및/또는 정제 (purification)에 이용되고, 상기 융합 단백질 유래의 태그 또는 캐리어 단백질의 선택적인 화합물 또는 단백질 가수분해적인 절단 (proteolytic cleavage)은 상기 표적 CNP 변이체를 제공한다. 추가적인 구현예에서, CNP 변

이체의 PEG화는 NHS- 또는 알데하이드-기초 화합물 또는 당업계에서 알려진 다른 화합물에 의하여 수행되는 컨쥬게이션 반응으로 화학적 또는 생물학적 합성 또는 그의 일부분으로 일어난다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 이황화 결합을 포함한다. 관련된 구현예에서, 상기 이황화 결합은 사이클릭 펩티드를 형성한다. 구체적인 구현예에서, 상기 이황화 결합은 CNP22의 6 및 22 포지션에 대응하는 포지션에서 시스테인 잔기간에 형성된다.

[0222] 상기 CNP 변이체는, 예를 들어, 헵타노익산 (heptanoic acid), 펜타노익산 (pentanoic acid) 또는 지방산 (fatty acids)과 같은 소수성 폴리머릭 또는 비폴리머릭 모이어티로 컨쥬게이트될 수 있다는 것이 추가적으로 고려된다. 상기 소수성 모이어티는 예를 들면, 리신 (lysine), 세린 (serine), 시스테인 (cysteine) 또는 트레오닌 (threonine)과 같은 아미노산 잔기의 곁사슬로 컨쥬게이트될 수 있거나, 또는 상기 CNP 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단으로 부착될 수 있다.

[0223] 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 CNP 변이체는 약 8 내지 약 10.5 또는 약 8.5 내지 약 10의 범위를 가지는 pI 를 갖는다.

[0224] 추가적인 구현예에서, 본 발명은 CNP 변이체를 포함하고, 선택적으로 다른 생물학적 활성제, 선택적으로 약학적으로 허용가능한 부형제(excipient), 담체(carrier) 또는 희석제(diluent)를 포함하는 약학 조성물 (pharmaceutical composition)을 제공한다. 몇몇 구현예에서, 상기 조성물은 비경구 투여 (parenteral injection)에 적절하도록 살균된 약학적 조성물이다. 몇몇 구현예에서, 상기 조성물은 실질적으로, 예컨대 최소한 약 90% 또는 95% 순수한 CNP 변이체를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 조성물은 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0.5%보다 적은 오염물질 (contaminants), 예컨대 인간 단백질 (human proteins), 돼지 단백질 (porcine proteins), 또는 CNP53 또는 그의 단편 (목적하는 CNP 변이체과 다른 것)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 살균된 조성물은 본 명세서에서 개시된 CNP-반응성 또는 질병 중 어느 것을 치료 또는 예방하기 위하여 대상에 투여된다.

[0225] 본 발명의 CNP 변이체는 유리한 CNP 활성을 유지하고 증가된 혈청 반감기를 보인다. CNP 활성의 유지는, 예를 들면, 목적하는 생체 내 생물학적 효능의 유지, 또는 동일한 농도 조건 하 (1μM CNP 펩티드 또는 ED80보다 크게)에서, CNP22의 cGMP 자극 활성이 최소한 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 최소한 약 100%이상으로 유지되는 것을 보일 수 있다. I몇몇 구현예에서, CNP 변이체는 CNP22에 비교하여 최소한 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배 또는 40배 증가한 혈청 반감기를 보인다.

[0226] 관련된 구현예에 있어서, 본 명세서에서 기재된 상기 CNP 변이체는 증가된 NEP 저항성을 가지고 야생형 CNP22와 비교하여 증가된 반감기를 보인다. 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체의 반감기는 야생형 CNP22와 비교하여 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 약 100%까지 증가한다.

[0227] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 상기 CNP 변이체는 야생형 CNP22와 비교하여 약 1.5배, 약 2배, 약 2.5배, 약 3매, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 또는 그 이상으로 생체내 cGMP 생산을 증가시키거나, 연골 또는 뼈 형성 또는 성장과 관련된 하나 또는 그 이상의 생체 내 바이오마커의 수준 증가시키거나, 생체 외 NEP 절단에 대한 저항성을 증가시키거나, 생체 내 혈장 또는 혈청 반감기를 증가시키거나, 생체내 생물학적 이용도 (bioavailability)를 증가시키거나, 또는 생체 내 특정한 뼈의 길이를 증가시키거나 또는 상기 증가의 조합에 의하여 영향을 준다.

[0228] 다른 구현예에서, 본 발명은 필요로 하는 대상에세 치료학적으로 유효한 양의 CNP 변이체를 투여하거나 또는 상기 CNP 변이체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 CNP에 반응하는 조건 또는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CNP 반응성 질병은 뼈 성장의 질병이고, 뼈 이형성증 (skeletal dysplasias) 및 피브로블라스트 성장 인자 수용체 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR-3) 돌연변이와 연관된 질병과 같이 유전성의 골격 기형을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 구현예에서 FGFR-3과 연관된 질병은 연골무형성증(achondroplasia)이다. 다른 구현예에서, CNP 반응성 질병은 혈관 평활근 (vascular smooth muscle) 세포 및 조직과 관련된 질병이다. 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 뼈 (예를 들어, 사지 뼈 (limb bone))의 성장판의 사이즈를 증가하는 데 유용하다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 골을 늘리거나 또는 긴 뼈 성장을 증가시키는데 유용하다. 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 연골 세포의 매트릭스 (matrix) 성장, 증식 및 분화를 촉진하는데 유용하다.

[0229] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 CNP 변이체는 약 5 또는 10 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 또는 약 20 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg범위의 복용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 약 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 또는 2000 nmol/kg, 또는 내과 의사가 적절하다고 생각하는 다른 복용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 약 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 또는 800 ug/kg, 또는 약 1 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg 또는 내과 의사가 적절하다고 생각하는 다른 복용량으로 투여된다. 본 명세서에서 기재된 CNP 변이체의 복용량은 복용 빈도(dosing frequency)/투여빈도(frequency of administration)에 의하며, 매일, 1주일에 2 또는 3번, 일주일마다, 2주일 마다, 3주일 마다, 한달마다 등등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0230] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 단회 (single treatment) 또는 반복 (multiple doses)하여 투여된다. 상기 반복 투여는 매일, 또는 치료과정에 따라서 다양한 복용량으로 투여될 수 있다. 어떤 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 단회 또는 반복하여, 매일, 이틀에 한번, 삼일에 한번, 일주일에 2번, 일주일에 3번, 매주 한번, 2주에 한번, 3주에 한번, 한달에 한번, 6주만에 한번, 2달에 한번, 3달에 한번 또는 내과 의사가 적절하다고 생각하는 다른 복용량으로 투여된다.

[0231] 어떤 구현예에서, CNP 변이체의 투여는 성장기 (예를 들어, 연골 생성 (chondrogenesis)) 및 뒤따르는 회복기 (예를 들어, 골형성 (osteogenesis))에 적절하도록 조정된다. 예를 들어, 상기 CNP 변이체는 피하의, 정맥 내로 또는 다른 방법으로 매일 또는 일주일에 수회 당분간 투여되고, 무처리되는 기간이 뒤이어 일어나고 나서, 상기 사이클이 반복된다. 몇몇 구현예에서, 초기 처리 (예컨대, 매일 또는 일주일에 수회 CNP 변이체의 투여)는 3일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주 또는 12주동안 이어진다. 관련된 구현예에서, 무처리 기간은 3일, 1주, 2주, 3주 또는 4주간 지속된다. 어떤 구현예에서, CNP 변이체의 투여 요법은 3일간 매일 투여 후 3일간 무처리하거나; 또는 일주일간 매일 또는 수회 투여 후 3일 또는 1주일 무처리하거나; 또는 2주간 매일 또는 일주일마다 수회 투여 후 1 주 또는 2 주간 무처리하거나; 또는 3주간 매일 또는 일주일마다 수회 투여 후 1, 2 또는 3 주간 무처리하거나; 또는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주간 매일 또는 일주일마다 수회 투여 후 1, 2, 3 또는 4주간 무처리하는 것이다.

[0232] 추가적인 구현예에서, 본 발명은 CNP 펩티드 또는 변이체를 대상에 투여하고, 대상에서 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커의 레벨을 모니터하는 것을 포함하는 CNP-반응성 질환 또는 질병을 치료하는 방법을 제공하는데, 여기에 있어서, 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커의 레벨의 상승 또는 하락은 대상 상기 CNP 펩티드 또는 변이체의 치료효과를 가리킨다. 몇몇 구현예에서, 바이오마커의 상기 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 증가할 때, 상기 바이오마커의 레벨의 증가는 대상에서 CNP 펩티드 또는 변이체의 치료효과를 나타낸다. 다른 구현예에서, 바이오마커의 상기 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 감소할 때, 상기 바이오마커의 레벨의 감소는 대상에서 CNP 펩티드 또는 변이체의 치료효과를 나타낸다

[0233] 추가적인 구현예에서, 상기 치료법은 CNP 펩티드 또는 변이체의 양 (또는 복용량) 또는 투여 빈도를 조절하는 것을 더 포함하는데, 여기에 있어서:

[0234] (i) 상기 바이오마커의 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 증가하는 경우, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골- 관련 바이오마커의 레벨이 목표 레벨 미만이라면, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체의 양 (또는 복용량) 또는 투여 빈도는 증가되고; 또는

[0235] (ii) 상기 바이오마커의 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 증가하는 경우, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골- 관련 바이오마커의 레벨이 목표 레벨을 초과하였다면, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체의 양 (또는 복용량) 또는 투여 빈도는 감소되거나; 또는

[0236] (iii) 상기 바이오마커의 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 감소하는 경우, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골- 관련 바이오마커의 레벨이 목표 레벨을 초과한다면, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체의 양 (또는 복용량) 또는 투여 빈도는 증가하거나; 또는

[0237] (iv) 상기 바이오마커의 레벨이 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장과 관련하여 감소하는 경우, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골- 관련 바이오마커의 레벨이 목표 레벨 미만이라면, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체의 양 (또는 복용량) 또는 투여 빈도는 감소된다.

[0238] 바이오마커의 목표 레벨은 대상에서의 치료능 및/또는 상기 질병 또는 상태의 증상을 완화하거나 개선하는 데 있어서 유익한 효능과 관련된 바이어마커의 레벨 또는 범위를 언급하는 것이 고려된다. 어떤 구현예에서, 목표

레벨을 초과하거나 또는 미만의 바이오마커의 레벨은 대상에게 유해하다.

[0239] 다른 구현예에서, 본 발명은 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장에 있어서 CNP 펩티드 또는 변이체의 투여에 의한 효능을 평가하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 방법은 생체 내 뼈 및 연골의 형성 및 성장에 있어서 CNP 펩티드 또는 변이체의 영향을 측정하기 위해, CNP 펩티드 또는 변이체를 투여했던 대상에서 최소한 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커의 레벨을 평가 또는 측정하는 방법을 제공한다. 관련된 구현예에서, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커 레벨의 증가는 CNP 펩티드 또는 변이체의 투여가 뼈 또는 연골의 형성 또는 성장에 있어서 긍정적인 효과를 가지고 뼈 이형성증 및 다른 뼈- 또는 연골-관련 질병 또는 감소된 CNP 활성과 연관된 질병의 치료에 유용하다. 예시적인 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커는 CNP (예를 들어, CNP-22 또는 CNP-53의 내인성(endogenous) 레벨), cGMP, 오스테오칼신 (osteocalcin), 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen , PCNA), I형 프로콜라겐 (procollagen, PINP)의 프로펩티드 및 그의 단편, I형 콜라겐 및 그의 단편, II형 콜라겐의 프로펩티드 및 그의 단편, II형 콜라겐 및 그의 단편, 아그레칸 콘드로이틴 설페이트 (aggrecan chondroitin sulfate) 및 알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0240] 추가적인 구현예에서, 본 발명은 대상에서 최소한 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커의 레벨 상에 CNP 펩티드 또는 변이체의 영향을 평가하는 방법에 관한 것이고, CNP 펩티드 또는 변이체를 투여했던 대상의 생물학적 샘플에 있어서 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커를 평가 또는 측정하는 것을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 방법은 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커의 레벨을 평가 또는 측정하기 전에 CNP 펩티드 또는 변이체를 대상로 투여하는 것을 추가적으로 포함한다.

[0241] 어떤 구현예에서, 최소한 하나의 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커는 CNP (예를 들어, CNP-22 또는 CNP-53의 내인성(endogenous) 레벨), cGMP, II형 콜라겐의 프로펩티드 및 그의 단편, II형 콜라겐 및 그의 단편, 오스테오칼신 (osteocalcin), 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen , PCNA), I형 프로콜라겐 (procollagen, PINP)의 프로펩티드 및 그의 단편, I형 콜라겐 및 그의 단편, 아그레칸 콘드로이틴 설페이트 (aggrecan chondroitin sulfate) 및 알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0242] 뼈- 또는 연골-관련 바이오마커와 관련된 방법 (예컨대, 치료, 진단, 평가 방법)의 몇몇 구현예에서, 상기 CNP 펩티드 또는 변이체는 CNP-22, CNP-53, 또는 본 명세서에서 기재한 CNP 펩티드 및 변이체의 하나이다. 특정 구체예에서, CNP 펩티드 또는 변이체는 CNP22 또는 CNP53이 아니다.

[0243] 다른 구현예에서, 본 발명은 CNP 변이체의 재조합 생산 방법을 제공하는데, 폴리뉴클레오티드에 의하여 암호화되는 융합 폴리펩티드의 발현을 초래하는 조건 하에서, 절단가능한 (cleavable) 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 연결된 CNP 변이체 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포를 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 관련된 구현예에서, 상기 숙주세포는 절단가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 연결된 CNP 변이체 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된다.

[0244] 일 구현예에서, 상기 벡터는 플라스미드이다. 또 다른 구현예에서, 상기 플라스미드는 pET-21a, pJexpress, pET-31b, pET-15b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pQE-30, pET-SUMO, pET-22b, 및 pTYB11으로 구성된 군에서 선택된다.

[0245] 어떤 구현예에서, 상기 절단가능한 펩티드 또는 단백질은 히스티딘 태그 (histidine tag), 인간 전사 인자 TAF12 (human transcription factor TAF12), 케토스테로이드 이소머라제 (ketosteroid isomerase), 말토오즈-결합 단백질 (maltose-binding protein), ß-갈락토시다제 (ß-galactosidase), 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (glutathione-S-transferase), 티오레독신 (thioredoxin), 키틴 결합 도메인 (chitin binding domain) 및 BMP-2 돌연변이로 구성된 군 또는 그의 단편으로부터 선택되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0246] 관련된 구현예에서, 상기 절단가능한 펩티드 또는 단백질은 절단제(cleaving agent)에 의하여 절단된다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단제는 포름산 (formic acid), 시아노겐 브로마이드 (cyanogen bromide , CNBr), 히드록실아민 (hydroxylamine), 단백질 자가 절단 (protein self cleavage), 인자 Xa (Factor Xa), 엔테로키나제 (enterokinase), ProTEV, 및 SUMO 프로테아제 (protease)로 구성된 군에서 선택된다. 추가적인 바람직한 절단제는 팔라듐 (palladium), 클로스트리파인 (clostripain), 트롬빈 (thrombin), 키모트립신 (chymotrypsin), 트립신 (trypsin), 트립신-유사 프로테아제 (trypsin-like proteases), 카복시펩티다제 (carboxypeptidase), 엔

테로펩티다제 (enteropeptidase), Kex 2 프로테아제 (Kex 2 protease), Omp T 프로테아제 (Omp T protease), 서브틸리신 (subtilisin), V8 프로테아제 (V8 protease), HIV 프로테아제 (HIV protease), 리노바이러스 프로테아제 (rhinovirus protease), 퓨리리신 프로테아제 (furilisin protease), IgA 프로테아제 (IgA proteases), 인간 페이스 프로테아제 (human Pace protease), 콜라게나제 (collagenase), Nia 프로테아제 (Nia protease), 폴리오바이러스 2Apro 프로테아제 (poliovirus 2Apro protease), 폴리오바이러스 3C 프로테아제 (poliovirus 3C protease), 제네나제 (genenase), 퓨린 (furin), 엘라스타제 (elastase), 프로티나제 K (Proteinase K), 펩신 (pepsin), 레닌 (rennin (키모신 (chymosin)), 미생물의 아스파틱 프로테아제 (microbial aspartic proteases), 파파인 (papain), 칼페인 (calpain), 키모파파인 (chymopapain), 피신 (ficin (피카인 (ficain))), 브로메라닌 (bromelain (브로메라제 (bromelase))), 카테스피신 B (cathespisin B), 카스파제스 (caspases), 써모리신 (thermolysin), 엔도프로테아제 Arg-C (Endoprotease Arg-C), 엔도프로테아제 Glu-C (Endoprotease Glu-C), 엔도프로테아제 Lys-C (Endoprotease Lys-C), 칼리크레인 (kallikrein) 및 플라스민 (plasmin)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0247] 어떤 구현예에서, 상기 융합 폴리펩티드는 용해성 단백질 또는 봉입체 (inclusion body)로 발현된다. 관련된 구현예에서, 본 발명은 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 발현된 융합 폴리펩티드를 분리하는 것에 관한 것이다. 추가적인 구현예에서, 상기 분리된 융합 단백질은 본 명세서에서 기재된 절단제와 접촉하게 된다.

[0248] 일 구현예에서, 본 발명은 발현 벡터를 포함하는 박테리아 숙주 세포를 제공하고, 상기 벡터는 절단가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 연결된, CNP 변이체 펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 절단가능한 펩티드 또는 단백질은 히스티딘 태그 (histidine tag), 인간 전사 인자 TAF12 (human transcription factor TAF12), 케토스테로이드 이소머라제 (ketosteroid isomerase), 말토오즈-결합 단백질 (maltose-binding protein), ß-갈락토시다제 (ß-galactosidase), 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (glutathione-S-transferase), 티오레독신 (thioredoxin), 키틴 결합 도메인 (chitin binding domain) 및 BMP-2 돌연변이로 구성된 군 또는 그의 단편으로부터 선택된다.

[0249] 다른 구현예에서, 상기 숙주세포는 이콜라이 (*E. coli*) 같은, 박테리아이다. 관련된 구현예에서, 상기 이콜라이 세포는 BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [C41(DE3)라고도 불리우는], C43[C43(DE3)라고도 불리우는], 오리가미(Origami) B(DE3), 오리가미(Origami) B(DE3)pLysS, KRX, 및 튜너(Tuner)(DE3)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가적인 구현예에서, 상기 숙주 세포는 상기 언급한 벡터를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 상기 숙주 세포는 세포 배양 전에 벡터로 형질전환된다.

[0250] 어떤 구현예에서, 상기 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드에 의하여 암호화되는 융합 폴리펩티드의 발현에 적당한 조건의 배지에서 배양된다. 일 구현예에서, 상기 융합 폴리펩티드는 용해성 단백질 또는 봉입체로 발현된다. 관련된 구현예에서, 상기 발현된 융합 폴리펩티드는 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 분리된다. 또 다른 구현예에서, 상기 분리된 융합 폴리펩티드는 본 명세서에서 개시한 절단제와 접촉된다.

도면의 간단한 설명

[0251] 도 1은 *E. coli*에서의 CNP 융합 단백질의 발현을 나타낸다(도 1a: 코마시 블루 염색, 도 1b: 웨스턴 블롯). M: 단백질 마커; T: 총 세포용해물; S: 가용성 상청액; P: 2ug CNP22; KSI: KSI-CNP(M/N) 융합 단백질 발현(불용성); N: 비-유발성 KSI-CNP 융합 단백질 총 용해물; KSI': KSI-P-CNP 융합 단백질 발현(불용성); Trx: Trx-P-CNP 융합 단백질 발현(가용성); MBP: MBP-P-CNP 융합 단백질 발현(가용성); TAF: TAF-P-CNP 융합 단백질 발현(불용성)(BL21); TAF': TAF-P-CNP 융합 단백질 발현(불용성) BL21(DE3), CNP는 Gly-CNP37이다.

도 2는 TAF-CNP 봉입체의 포름산에 의한 절단을 나타낸다. M: 단백질 마커; 1: Gly-CNP37 양성 대조군; 2: 미절단 TAF-CNP 봉입체; 3: 2% 포름산 절단된 TAF-CNP 봉입체, CNP는 Gly-CNP37이다.

도 3a~3e는 *E. coli*에서의 CNP 융합 단백질의 발현을 나타낸다. M: 단백질 마커; Tu: 총 비유발성 세포용해물; Su: 비유발성 가용성 상청액; T: 총 유발성 세포 용해물; S: 가용성 상청액; C1: CNP22; C: Gly-wtCNP37("CNP38"); P: 불용성 펠릿. A: KSI: KSI-CNP38(M/N) 융합 단백질 발현(불용성); KSI': KSI-Pro-CNP38(Pro-Gly-wtCNP37은 "Pro-CNP38"이라고 지정된다) 융합 단백질 발현(불용성); Trx: Trx-Pro-CNP38 융합 단백질 발현(가용성); MBP: MBP-Pro-CNP38 융합 단백질 발현(가용성); TAF: BL21 세포의 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질 발현(불용성); TAF': BL21(DE3) 세포의 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질 발현(불용성). B: TAF-Pro-CNP37 및 BMP-Pro-CNP37 융합 단백질 발현. C: BMP-Pro-CNP38 융합 단백질 및 BMP 단백질 발현. D: TAF-Pro-HSA-CNP(Pro-GHKSEVAHRFK-wtCNP27(서열번호 188)은 "Pro-HSA-CNP"라고 지정된다) 융합 단백질 발현. E: TAF-Pro-

CNP38 융합 단백질 및 TAF 단백질 발현.

도 4a~4c는 TAF-Pro-CNP38 봉입체의 포름산에 의한 절단을 나타낸다. A: 50% 포름산에 의한 TAF-Pro-CNP38 봉입체의 절단. M: 단백질 마커; U: 미절단 TAF-Pro-CNP38 봉입체; 25℃, 37℃, 42℃, 55℃: TAF-Pro-CNP38 봉입체를 25℃, 37℃, 42℃ 또는 55℃에서 50% 포름산 중에서 24시간 절단한다. 37℃-S 및 55℃-S: 37℃ 및 55℃ 절단 반응물의 가용성 상청액을 10N NaOH로 중화하고, 14,000rpm에서 15분 원심분리했다. B: 10% 및 2% 포름산에 의한 TAF-Pro-CNP38 봉입체의 절단. M: 단백질 마커; U: 미절단 TAF-Pro-CNP38 봉입체; C: 포름산 절단된 TAF-Pro-CNP38; S: 중화 없이 14,000rpm에서 5분 원심분리한 후의 가용성 상청액; P: 중화 없이 14,000rpm에서 5분 원심분리한 후의 불용성 펠릿. C: 2% 및 10% 포름산 절단된 TAF-Pro-CNP38 봉입체 산물들의 LC/MS 분석.

도 5a~5c는 상이한 온도 및 시간에서 수행된 TAF-Pro-CNP38 봉입체의 포름산에 의한 절단을 나타낸다. M: 단백질 마커; C: Gly-wtCNP37("CNP38") 양성 대조군; U: 미절단 TAF-Pro-CNP38 봉입체. A: 6, 24 또는 48시간 42℃, 55℃ 또는 70℃에서 2% 포름산으로 절단된 TAF-Pro-CNP38. B: 17 또는 24시간 동안 55℃, 60℃, 65℃ 또는 70℃에서 2% 포름산으로 절단된 TAF-Pro-CNP38. C: 2% 포름산으로 절단된 TAF-Pro-CNP38 봉입체 산물들의 LC/MS 분석.

도 6은 TAF-CNP34 융합 단백질의 발현에 대한 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)이다. M: 단백질 마커; C: 대조군 [Gly-CNP37("CNP38")]; T: 총 세포용해물; S: 상청액; TI: 총 세포용해물 유발성; SI: 상청액 유발성.

도 7은 융합 단백질 TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38, TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38, 및 TAF-Pro-CNP53의 발현에 대한 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)으로서, "Pro-CNP38"은 Pro-Gly-CNP37을 표시한다. M: 단백질 마커; C: 대조군 [Gly-CNP37 ("CNP38")]; T: 총 세포용해물; TI: 총 세포용해물 유발성; S: 상청액; SI: 상청액 유발성.

도 8은 융합 단백질 TAF-CNP34 및 TAF-Pro-CNP53의 포름산 절단 산물의 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)이다. M: 단백질 마커; P: 양성 대조군[Gly-CNP37("CNP38")]; U: 미절단; C: 절단; CS: 절단 상청액; CP: 절단 펠릿.

도 9는 TAF-CNP34의 포름산 절단 후 CNP-34의 피크를 나타낸 LC/MS 크로마토그램이다.

도 10은 TAF-Pro-CNP35의 포름산 절단 후 Pro-CNP-53의 피크를 나타낸 LC/MS 크로마토그램이다.

도 11은 융합 단백질 TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38 및 TAF(4D/4E)-Pro-CNP38의 발현에 대한 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)으로서, "Pro-CNP38"은 Pro-Gly-CNP37을 표시한다. M: 단백질 마커; C: 대조군[Gly-CNP37("CNP38")]; T: 총 세포용해물; TI: 총 세포용해물 유발성; S: 상청액; SI: 상청액 유발성.

도 12는 융합 단백질 TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 및 TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38의 포름산 절단 산물의 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)으로서, "Pro-CNP38"은 Pro-Gly-CNP37을 표시한다. M: 단백질 마커; P: 양성 대조군[Gly-CNP37("CNP38")]; U: 미절단; C: 절단; CS: 절단 상청액; CP: 절단 펠릿.

도 13은 융합 단백질 TAF-NL-(C/A&6D/6E)-Pro-CNP38 및 TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38의 포름산 절단 산물의 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)으로서, "Pro-CNP38"은 Pro-Gly-CNP37을 표시한다. M: 단백질 마커; P: 양성 대조군[Gly-CNP37("CNP38")]; U: 미절단; C: 절단; CS: 절단 상청액; CP: 절단 펠릿.

도 14는 BL21(DE3) 세포의 10L 발효시 생산된 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질을 항-CNP항체를 이용한 웨스턴 블롯으로서, 세포는 OD_{600} = 64 및 시간 17에서 유발되었고, "Pro-CNP38"은 Pro-Gly-CNP37을 표시한다.

도 15는 미정제 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 산물의 SP-Sepharose 양이온-교환 칼럼 크로마토그래피의 용출 분획들의 SDS-PAGE(코마시 블루 염색)이다. A: TAF-Pro-CNP38 봉입체(IB) 수용액; B: IB 포름산염 용액; C: IB 포름산염 용액, 중화; D: 중화 펠릿; E: 중화 상청액; F: TMAE Hi-CAP 로드; G: TMAE Hi-CAP 관류/SP-Sepharose 로드; H: SP-Sepharose 관류; SP-Sepharose 용출 분획 1~47: 10uL/레인.

도 16은 생체내에서 중성 엔도펩티다제(NEP)에 콘쥬게이트된 N-말단 PEG화 CNP22 콘쥬게이트의 내성도를 나타낸다.

도 17은 N-말단 아미노산 확장 CNP 변이체들의 NEP 내성도를 나타낸다["CNP27"은 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)이다].

도 18은 N-말단 PEG화 CNP17 및 GANRR-CNP22(K4R)("CNP27")(서열번호 36)의 NEP 내성도를 나타낸다.

도 19는 wtCNP22 및 CNP 변이체들인 Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27(도면에서 "CNP27-HSA")(서열번호144)와 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(도면에서 "CNP27-PEO12")(서열번호 36)의 NEP 내성도를 나타낸다.

도 20은 생체외에서 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극할 수 있는 N-말단 아미노산 확장 CNP 변이체들의 능력을 나타낸다. 이 결과는 1uM CNP22의 존재하에서 생산된 cGMP 수준과 비교된다. "CNP27"은 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)이다.

도 21은 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극할 수 있는 N-말단 PEG화 CNP17 및 GANRR-CNP22(K4R)("CNP27")(서열번호 36)의 능력을 나타낸다.

도 22는 cGMP 생성에 대한 CNP22의 N-말단 PEG화의 효과를 나타낸다.

도 23은 NIH3T3 세포에서 wtCNP22 및 CNP 변이체들인 Gly-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27("CNP27-HSA")(서열번호 144), wtCNP29 및 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36)에 의해 유발된 cGMP 생산을 나타낸다.

도 24a 및 24b는 CNP-22 및 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")가 NPR-B를 통해 유사한 용량 반응 곡선으로 NPR-A를 통한 것보다는 훨씬 넓은 범위로 cGMP 생산을 자극했고, 생체외 신호화 경쟁 분석에서 NPR-B 대 NPR-C 선택성에 대해 유사한 프로파일을 보였음을 나타낸다.

도 25는 하루 1회 1시간 또는 하루 1회 2시간 CNP22에 래트 연골육종 세포를 노출한 것이 CNP22에 연속 노출한 것과 연골세포 성장의 FGF2-유발 억제를 반전시키는데 있어서 실질적으로 유사한 효능을 가진다는 것을 증명한다.

도 26a 및 26b는 FGF2-억제성 래트 연골육종(RCS) 세포에 대한 CNP22 효과의 용량 반응 연구 결과를 나타낸다.

도 27a~27d는 바탕질에 35S-술페이트 및 3H-Pro를 편입시키거나, 바탕질로부터의 감소에 의해 평가했을 때, FGF2에 의해 억제된 RCS 세포에 CNP22를 첨가한 것이 바탕질 합성을 증가시키고, FGF2를 부분적으로 억제하는 것을 나타낸다. 패널 A 및 C, 합성; B 및 D, 분해; A 및 B, 35S 측정; C 및 D, 3H 측정. 통계적으로 유의한 차이가 강조된다(ANOVA; *p<0.05, **p<0.01).

도 28a~28c는 FGF2 및 CNP22와 함께 배양된 RCS 세포에서 아그레칸 및 피브로넥틴(mRNA, 패널 A 및 C, 및 단백질, 패널 B) 생산 수준을 나타낸다.

도 29는 생체외 마우스 기관 모델에서 야생형 대퇴골의 장축 성장을 자극하는데 있어서 CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(도면에서 "CNP27-PEO24")(서열번호 36)의 효능을 나타낸다.

도 30은 2일마다 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 2~3일령 야생형 마우스 경골의 장축 뼈 성장을 나타낸다. 결과는 치료 전(제0일) 측정치에 맞춰 정규화된다. 데이터는 평균±SEM(n=8)로 표시된다.

도 31은 2일마다 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 2~3일령 연골무형성증 $FGFR3^{ach}$ 마우스 경골의 장축 뼈 성장을 나타낸다. 결과는 치료 전(제0일) 측정치에 맞춰 정규화된다. 데이터는 평균±SEM(n=7~8)로 표시된다.

도 32는 2일마다 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 2~3일령 야생형 마우스 대퇴골의 장축 뼈 성장을 나타낸다. 결과는 치료 전(제0일)의 측정치에 맞춰 정규화된다. 데이터는 평균±SEM(n=8)로 표시된다.

도 33은 2일마다 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 2~3일령 연골무형성증 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골의 장축 뼈 성장을 나타낸다. 결과는 치료 전(제0일)의 측정치에 맞춰 정규화된다. 데이터는 평균±SEM(n=3~7)로 표시된다.

도 34a~34i는 2일마다 생체외 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골에서 CNP37의 생체분포를 나타낸다. 패널 A~C는 원위 대퇴부에서의 분포를 나타내고, 패널 D~F는 관절 연골세포에서의 분포를 나타내고, 패널 G~I는 비후성 연골세포에서의 분포를 나타낸다.

도 35a~35c는 8일 동안 2일마다 CNP22 또는 CNP37로 야생형 및 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골을 치료한 후 성장판에서 증식성 기둥들의 세포충실성을 나타낸다. (A) 치료하지 않음, (B) 치료 후의 기둥당 세포수, (C) 치료 후의 형태학적 연구. 도 35c(i) 내지 c(vi)의 패널은 도 35b에 제시된 샘플 순서와 일치한다. 데이터는 평균±SEM(n=4~8)로 표시된다.

도 36a~36c는 8일 동안 2일마다 CNP22 또는 CNP37로 야생형 및 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골을 생체외 치료한 후 연골세포 비후성을 나타낸다. (A) 치료하지 않음, (B) 치료 후의 세포 크기, (C) 치료 후의 형태학적 연구. 도 36c(i) 내지 c(vi)의 패널은 도 36b에 제시된 샘플 순서와 일치한다. 데이터는 평균±SEM(n=4~9)로 표시된다.

도 37a~37i는 생체내 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스 경골에서 CNP37의 생체분포를 나타낸다. 패널 A~C는 원위 대퇴골에서의 분포를 나타내고, 패널 D~F는 관절 연골세포에서의 분포를 나타내고, 패널 G~I는 비후성 연골세포에서의 분포를 나타낸다.

도 38a~38c는 $FGFR3^{ach}$ 마우스 경골 성장판에 대한 CNP37의 생체내 효과를 예시한다: (A) 총 성장판 두께, (B) 증식 영역 두께, 및 (C) 비후성 영역 두께. 데이터는 평균±SEM(n=7~15)로 표시된다.

도 39는 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)로 생체외 치료된 야생형 마우스 대퇴골로부터 얻은 컨디셔닝 배지 중의 cCMP 수준을 나타낸다($p < 0.01$).

도 40은 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)로 생체외 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골로부터 얻은 컨디셔닝 배지 중의 cCMP 수준을 나타낸다($p < 0.01$).

도 41은 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)로 생체외 치료된 야생형 마우스 경골로부터 얻은 컨디셔닝 배지 중의 cCMP 수준을 나타낸다($p < 0.01$).

도 42는 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)로 생체외 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스 경골로부터 얻은 컨디셔닝 배지 중의 cCMP 수준을 나타낸다($p < 0.01$).

도 43은 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)에 야생형 및 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골을 생체외 노출하는 것이 컨디셔닝 배지에서 절단된 II형 콜라겐의 수준을 증가시켰음을 나타낸다($p < 0.05$).

도 44는 야생형 마우스 및 $FGFR3^{Y367C}$ 마우스(중증 연골무형성증의 마우스 모델)로부터 분리되어 6일 동안 비히클 또는 1uM Pro-Gly-CNP37("ProCNP38")로 생체외 처리된 대퇴골 뼈의 비후성 영역을 나타내며, Pro-Gly-CNP37 처리가 뼈 성장을 증가시키고, 성장판을 확장시켰다는 것이 증명된다.

도 45는 래트에 정맥내(i.v.) 투여된 CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)가 CNP22보다 혈장에서 훨씬 더 긴 반감기와 훨씬 더 큰 생체이용률을 가진다는 것을 나타낸다.

도 46은 래트에 피하(s.c.) 투여된 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)도 역시 CNP22보다 혈장에서 훨씬 더 긴 반감기와 훨씬 더 큰 생체이용률을 가진다는 것을 타나낸다.

도 47은 정맥내 투여된 CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)가 CNP22보다 래트에서 cGMP 생산을 훨씬 더 높은 수준으로 자극한다는 것을 나타낸다.

도 48은 피하 투여된 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)와 CNP37(더 적은 범위로)이 CNP22보다 래트에서 cGMP 생산을 자극하는데 실질적으로 더 효과적임을 나타낸다.

도 49는 Gly-CNP37 또는 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 야생형 마우스의 체중 측정치를 나타낸다.

도 50은 Gly-CNP37 또는 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 야생형 마우스의 꼬리 길이 측정치를 나타낸다.

도 51은 신체 길이에 대한 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에 의한 $FGFR3^{ach}$ 마우스 치료의 효과를 나타낸다($p=0.02$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 52는 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 꼬리 길이에 대한 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 나타낸다.

도 53a 및 53b는 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 원위 장골(A 척골; B 경골) 길이에 대한 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 나타낸다($p<0.01$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 54a 및 54b는 FGFR3^{ach} 마우스의 근골(A 상완골; B 대퇴골) 길이에 대한 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 나타낸다($p<0.01$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 55는 FGFR3^{ach} 마우스에서 관찰된 대퇴골:경골 비율로 평가했을 때, CNP37 투여가 근경지(rhizomelia)(근위 팔다리 길이의 불균형)를 보정한다는 것을 나타낸다($p<0.01$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 56은 FGFR3^{ach} 마우스의 두부 길이에 대한 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 나타낸다($p<0.01$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 57은 CNP37에 의한 FGFR3^{ach} 마우스의 치료가 외이도(EAM)의 크기를 증가시킨다는 것을 나타낸다(EAM)($P=0.03$, 1-테일드 t-테스트, 부등 변량).

도 58은 연골무형성증 마우스에서 척추 길이에 대한 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 나타내며, 이것은 척추체의 신장으로서 표현된다(예를 들어, 5번 요추).

도 59는 CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에 의한 FGFR3^{ach} 마우스의 치료가 투약 15분 후에 cGMP 혈장 수준을 증가시켰음을 나타낸다.

도 60은 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 5주 치료된 FGFR3^{ach} 마우스에서 절단된 II형 콜라겐의 혈청 수준을 나타낸다.

도 61은 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 5주 치료된 FGFR3^{ach} 마우스에서 오스테오칼신의 혈청 수준을 나타낸다.

도 62는 Gly-CNP37 또는 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 야생형 마우스의 투약 15분 후 cGMP 혈장 수준을 나타낸다($p<0.05$).

도 63은 Gly-CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 5주 치료된 야생형 마우스에서 절단된 II형 콜라겐의 혈청 수준을 나타낸다.

도 64~66은 야생형 마우스에 비히클, 또는 20nmol/kg 또는 70nmol/kg Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")을 투여한 후, cGMP, 절단된 II형 콜라겐 및 알칼리성 포스파타제의 수준을 나타낸다.

도 67 및 68은 상이한 투약 섭생에 따라서 비히클 또는 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")을 투여한 후, 절단된 II형 콜라겐 및 총 알칼리성 포스파타제의 수준을 나타낸다.

도 69는 제1일과 비교하여 제37일째에 두 개별적 연구(S1 및 S2)에서 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 및 비히클 치료된 동물의 신장의 상대적 증가를 나타낸다.

도 70a 및 70b는 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")의 투여 후, 뼈 무기질 밀도(A) 및 뼈 무기질 함량(B)의 변화를 나타낸다.

도 71은 CNP 변이체의 마지막 피하 투여 15분 후 혈장 cGMP 수준을 나타내며(제36일), 도 71~73에서 Gly-wtCNP37은 "CNP38", Pro-Gly-wtCNP37은 "Pro-CNP38", 그리고 GHKSEVAHRFK-wtCNP27(서열번호 144)은 "HSA-CNP27"이다.

도 72는 Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 또는 GHKSEVAHRFK-CNP27(서열번호 144)로 치료된 마우스에서 절단된 II형 콜라겐의 혈청 수준을 나타낸다.

도 73은 Gly-CNP37, Pro-Gly-CNP37 또는 GHKSEVAHRFK-CNP27(서열번호 144)로 치료된 마우스에서 알칼리성 포스파타제의 혈청 수준을 나타낸다.

도 74a 및 74b는 1uM Gly-CNP37에 의한 급성(A) 또는 만성(B) 치료 후, cGMP 반응의 탈감작을 나타낸다.

도 75a는 8일 동안 200nmol/kg의 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")로 야생형 마우스를 매일 치료한 것이 cGMP 반응을 탈감작하지 않았음을 나타낸다. 도 75b는 연속 2일 동안 하루 1회 200nmol/kg Pro-Gly-CNP37로 마우스를 치료한 것이 cGMP 반응을 강화했음을 나타낸다.

도 76a~76d는 200nmol/kg Gly-CNP37에 의한 야생형 마우스의 치료가 원위 대퇴골(연골 및 뼈)(A), 대퇴골 피질

(뼈)(B), 이도(연골)(C) 및 신장(D)에서 cGMP 분비를 자극했음을 나타낸다. 도 76e~76h는 간(E), 심장(F), 폐(G) 및 뇌(H) 조직이 연구된 시점에서 부형제 대조군에 비하여 Gly-CNP37에 반응하여 인지가능한 cGMP 분비를 보이지 않았음을 나타낸다.

도 77~82는 비히클 또는 10ug/kg 또는 36ug/kg의 Pro-Gly-CNP37을 매일 피하 주사한 정상 소아 시노몰거스(cynomolgus) 원숭이에서 진행중인 연구의 결과를 나타낸다. Pro-Gly-CNP37의 두 용량은 성장판 너비를 증가시켰고(도 77), 다리 길이를 증가시켰고(도 79), 팔 길이를 증가시켰고(도 80), 신장을 증가시켰고(도 81), 그리고 알칼리성 포스파타제의 혈청 수준을 증가시켰다(도 82).

도 83은 Gly-CNP37 제제에 대한 pH 3~8 및 5℃, 25℃ 및 40℃에서 pH에 따른 분해 속도 상수(K_{obs}) 관찰 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0252] 본 출원은 2009년 10월 23일에 출원된 미국 가출원 제61/254,563호와 2009년 5월 20일에 출원된 미국 가출원 제61/180,112호에 기초하여 우선권을 주장하며, 상기 개시한 것들은 전체가 참조로서 본 명세서에 채용된다.

[0253] 본 발명은 NEP 및/또는 NPR-C에 대한 친화성이 감소되고, NEP에 의한 제거 및/또는 NPR-C에 의한 제거에 대한 감수성이 감소된 CNP의 신규 변이체들, 이러한 CNP 변이체들을 포함하는 제약 조성물, 및 CNP에 반응성인 질병들을 치료하기 위한 이러한 CNP 변이체들의 사용 방법에 관한 것이며, 상기 질병들은 제한은 아니지만 뼈-관련 질병들, 예를 들어 연골무형성증 및 혈관 평활근 세포 및 조직과 관련된 질병들을 포함한다.

[0254] **A. 정의**

[0255] 다른 언급이 없다면, 명세서와 청구범위를 포함하는 본 출원에서 사용된 다음 용어들은 아래 주어진 정의를 가진다.

[0256] 명세서와 첨부된 청구범위에서 사용된, 부정관사 "한" 및 "한", 그리고 정관사 "그"는 문맥상 명확하게 다른 의미가 아니라면 단수형뿐만 아니라 복수형도 포함한다.

[0257] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대한 허용가능한 오차를 의미하며, 이것은 상기 값이 측정되거나 결정되는 방식에 일부 좌우된다. 특정 구체예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 1, 2, 3 또는 4 이내의 표준편차를 의미한다. 특정 구체예에서, "약" 또는 "대략"은 주어진 값이나 범위의 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.05% 이내를 의미한다. 용어 "약" 또는 "대략"이 일련의 둘 이상의 숫자 값들에서 최초의 숫자 값의 앞에 있을 때는 항상 "약" 또는 "대략"이란 용어가 이 일련의 숫자 값들의 각기 하나 마다에 적용되는 것으로 이해된다.

[0258] 용어 "주위 온도" 및 "실온"은 본원에서 호환하여 사용되며, 주위 환경의 온도를 말한다(예를 들어, 반응이 수행되거나, 조성물이 보관되는 곳). 특정 구체예에서, 주위 온도 또는 실온은 약 15℃ 내지 약 28℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃, 또는 약 20℃ 내지 약 28℃, 또는 약 20℃ 내지 약 25℃, 또는 약 22℃ 내지 약 28℃, 또는 약 22℃ 내지 약 25℃의 범위이다. 다른 구체예에서, 주위 온도 또는 실온은 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 20℃, 21℃, 22℃, 23℃, 24℃, 25℃, 26℃, 27℃ 또는 28℃이다.

[0259] 표준 화학 용어의 정의는 Carey and Sundberg, Advanced Organic Chemistry, 3rd Edition, Vols. A 및 B(Plenum Press, New York 1992)를 포함하는 참고 서적에서 찾을 수 있다. 본 발명의 실시에는, 다른 언급이 없다면, 본 분야의 기술범위 내에서 합성유기화학, 질량분광법, 예비 및 분석 크로마토그래피, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 제약학의 특정한 기존 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들어, Proteins: Structures and Molecular Properties(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., 4th Edition, 2004); Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology(S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition(Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)를 참조한다.

[0260] 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허출원은 그 전문이 참고자료로 본원에 포함된다.

[0261] 다음의 아미노산 약자들이 본 명세서에서 사용된다:

[0262] 알라닌: Ala(A) 아르기닌: Arg(R)

[0263] 아스파라긴: Asn(N) 아스파르트산: Asp(D)

[0264] 시스테인: Cys(C) 글루타민: Gln(Q)

[0265] 글루탐산: Glu(E) 글리신: Gly(G)

[0266] 히스티딘: His(H) 이소로이신: Ile(I)

[0267] 로이신: Leu(L) 리신: Lys(K)

[0268] 메티오닌: Met(M) 페닐알라닌: Phe(F)

[0269] 프롤린: Pro(P) 세린: Ser(S)

[0270] 트레오닌: Thr(T) 트립토판: Trp(W)

[0271] 티로신: Tyr(Y) 발린: Val(V)

[0272] "폴리펩티드" 및 "단백질"은 펩티드 결합 또는 펩티드 결합 동배체를 통해 연결된, 아미노산 잔기들로 이루어진 폴리머, 이와 관련된 자연적으로 발생하는 구조적 변이체들 및 이들의 자연적으로 발생하지 않는 합성된 유사체를 말한다. 합성 폴리펩티드는, 예를 들어 자동 폴리펩티드 합성장치를 사용하여 합성될 수 있다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 산물의 최소 길이에 제한이 없다. 용어 "단백질"은 전형적으로 대형 폴리펩티드를 말한다. 용어 "펩티드"는 전형적으로 짧은 폴리펩티드를 말한다. 따라서, 펩티드, 올리고펩티드, 다이머, 멀티머 등이 이 정의에 포함된다. 전장 단백질과 그것의 단편도 모두 이 정의에 포함된다. 또한, 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 폴리펩티드나 단백질의 발현 후 변형들, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 취지에 있어서, "폴리펩티드"는 천연 서열에 대한 결실, 부가, 치환(이것은 자연 상태에서 보존되는 것일 수도 있고, 사람 단백질에 공통적으로 존재하는 20개 아미노산 중 하나, 또는 어떤 다른 자연 발생 또는 자연 발생이 아닌 또는 비정형의 아미노산에 의한 치환을 포함할 수 있다), 및 화학적 변형(예를 들어, 펩티도의태체의 부가 또는 치환)과 같은 "변형"을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발이나, 또는 화학적 부분을 제거 또는 부착하기 위한 아미노산의 화학적 변형을 통한 것처럼 계획적일 수도 있고, 또는 단백질을 생산하는 숙주에 생긴 돌연변이나, 또는 PCR 증폭으로 인한 에러를 통한 것처럼 우연한 것일 수도 있다.

[0273] 폴리펩티드 서열을 표현하기 위해 종래의 표시법이 본원에서 사용되는데, 폴리펩티드 서열의 좌측 단부는 아미노-말단이고, 폴리펩티드 서열의 우측 단부는 카르복실-말단이다.

[0274] "보존성 치환"은 폴리펩티드의 아미노산이 기능적으로, 구조적으로 또는 화학적으로 유사한 천연 또는 비천연 아미노산으로 치환된 것을 말한다. 한 구체예에서, 다음 그룹들은 각각 서로에 대해서 보존성 치환체인 천연 아미노산을 함유한다:

[0275] (1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

[0276] (2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0277] (3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0278] (4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0279] (5) 이소로이신(I), 로이신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및

[0280] (6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0281] 다른 구체예에서, 다음의 그룹들은 각각 서로에 대해서 보존성 치환체인 천연 아미노산을 함유한다:

[0282] (1) 글리신(G), 알라닌(A);

[0283] (2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E);

[0284] (3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0285] (4) 아르기닌(R), 리신(K);

[0286] (5) 이소로이신(I), 로이신(L), 메티오닌(M), 발린(V), 알라닌(A);

[0287] (6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W); 및

[0288] (7) 세린(S), 트레오닌(T), 시스테인(C).

[0289] 다른 구체예에서, 아미노산은 하기 설정된 대로 그룹화될 수 있다.

[0290] (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp;

[0291] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0292] (3) 산성: Asp, Glu;

[0293] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0294] (5) 백본 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및

[0295] (6) 방향족: Trp,Tyr, Phe, His.

[0296] 한 구체예에서, 본원에 설명된 펩티드 또는 폴리펩티드는 CNP 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 재조합 수단을 통해서 생성된다. 따라서, 본 발명은 본원에 설명된 CNP 변이체들 중 어느 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 발현 조절 서열에 선택적으로 연결된 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포 또는 벡터, 및 이러한 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 CNP 변이체를 생산하는 방법을 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오티드에 의해 발현된 CNP 변이체들은 CNP 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 조건에서 배양 배지 중에서 숙주 세포를 성장시키는 단계, 및 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 발현 산물을 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해서 생산될 수 있다. 실제 발현 산물은 번역 후 가공 과정에 따라서 암호화된 단백질 산물과 약간 다를 수 있다.

[0297] "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위들로 이루어진 중합체를 말한다. 폴리뉴클레오티드는 자연 발생 핵산, 예를 들어 데옥시리보핵산("DNA") 및 리보핵산("RNA")뿐만 아니라 핵산 유사체들도 포함한다. 용어 "핵산"은 전형적으로 대형 폴리뉴클레오티드를 말한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 전형적으로 짧은 폴리뉴클레오티드를 말하며, 일반적으로 약 50개 뉴클레오티드 이하의 것을 말한다. 뉴클레오티드 서열이 DNA 서열(즉, A, T, G, C)로 나타날 때, 뉴클레오티드 서열은 RNA 서열(즉, A, U, G, C)도 역시 포함한다는 것이 이해될 것이며, 여기서 "U"는 "T"를 치환한다. "cDNA"는 mRNA에 상보하는, 또는 동일한 DNA를 말하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 형태이다.

[0298] "발현 조절 서열"은 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되어 뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 뉴클레오티드 서열을 말한다. "작동 가능하게 연결된"은 한 부분의 활성(예를 들어, 전사 조절 능력)이 다른 부분에 대해 작용하는(예를 들어, 서열의 전사) 관계에 있는 두 부분의 기능적 관계를 말한다. 발현 조절 서열은, 제한은 아니지만, 예를 들어 프로모터(예를 들어, 유도성 또는 구성성), 인핸서, 전사 터미네이터, 시작 코돈(즉, ATG), 인트론의 스플라이싱 신호, 및 중단 코돈의 서열들을 포함할 수 있다.

[0299] "재조합 폴리뉴클레오티드"는 서로 자연적으로 연결된 것이 아닌 서열을 가진 폴리뉴클레오티드를 말한다. 증폭된, 또는 조립된 재조합 폴리뉴클레오티드는 적합한 벡터에 포함될 수 있으며, 이 벡터를 사용하여 적합한 숙주 세포를 형질전환할 수 있다. 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"라고 한다. 이러한 재조합 숙주 세포에서 유전자가 발현되어, 예를 들어 "재조합 폴리펩티드"가 생산된다. 재조합 폴리뉴클레오티드는 비-코딩 기능(예를 들어, 프로모터, 복제 기원, 리보솜-결합 부위 등)도 역시 가질 수 있다.

[0300] 본원에서 사용된 "키메라"는 재조합 발현 또는 화학적 가교와 같은 본 분야에 일반적으로 공지된 기술을 사용하여 직접 또는 간접적으로 서로 부착되거나 연결된, 적어도 2개의 이종성 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열(즉, 상이한 출처로부터 유래되거나, 또는 자연 발생 서열로서 서로 회합되어 있지 않은)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 한 구체예에서, 이종성 서열은 CNP 펩티드 또는 변이체으로부터 절단될 수 있는 단백질 또는 펩티드를 포함하여, CNP 펩티드 또는 변이체에 직접 또는 간접적으로 연결된 단백질 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 관련된 구체예에서, CNP 변이체들은 본원에 설명된 키메라이다.

[0301] 특정 구체예에서, 키메라는 절단가능한 담체 단백질 또는 펩티드 꼬리표를 포함하는 CNP 융합 단백질을 포함한다. 용어 "절단가능한 담체 단백질 또는 절단가능한 펩티드 꼬리표"는 이종성 폴리펩티드 서열에 직접, 또는 링커를 통해 간접적으로 융합될 수 있는 펩티드 또는 폴리펩티드 서열을 말하며, 이들은 이종성 폴리펩티드 또는 단백질로부터 절단될 수 있는 펩티드 또는 폴리펩티드를 절단하거나 또는 분리하는 제제를 사용하여 이종성 서열로부터 제거될 수 있다. 어떤 구체예에서, 절단가능한 담체 단백질 또는 펩티드 꼬리표는 융합 단백질 또

는 이종성 폴리펩티드의 생성, 정제 및/또는 검출을 개선한다. 절단가능한 담체 단백질 및 펩티드 꼬리표의 예는, 제한은 아니지만 사람 전사인자 TAF12(TAF12), 케토스테로이드 이소머라제(KSI), 말토스-결합 단백질(MBP), β-갈락토시다제(β-Gal), 글루타티온-S-트랜스페라제(GST), 티오레독신(Trx), 키틴-결합 도메인(CBD), BMP-2 돌연변이(BMPM), SUMO, CAT, TrpE, 포도상구균 단백질 A, 연쇄구균 단백질, 녹말-결합 단백질, 엔도글루카나제 A의 셀룰로오스-결합 도메인, 엑소글루카나제 Cex의 셀룰로오스-결합 도메인, 바이오틴-결합 도메인, recA, Flag, c-Myc, 폴리(His), 폴리(Arg), 폴리(Asp), 폴리(Gln), 폴리(Phe), 폴리(Cys), 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질, 청록색 형광 단백질, 바이오틴, 아비딘, 스트렙토아비딘, 항체 에피토프, 및 이들의 단편을 포함한다.

[0302] "절단제"는, 예를 들어 이종성 폴리펩티드 또는 단백질로부터 절단가능한 펩티드 또는 폴리펩티드를 절단하거나 또는 분리하는데 유용한 제제이다. 절단제의 예는 제한은 아니지만, 팔라듐, 시아노겐 브로마이드(CNBr), 포름산, 히드록실아민, 클로스트리파인, 트롬빈, 키모트립신, 트립신, 트립신-유사 프로테아제, 카르복시펩티다제, 엔테로키나제(엔테로펩티다제), Kex2 프로테아제, Omp T 프로테아제, 인자 Xa 프로테아제, 섭틸리신, proTEV, SUMO 프로테아제, V8 프로테아제, HIV 프로테아제, 리노바이러스 프로테아제, 푸릴리신 프로테아제, IgA 프로테아제, 사람 Pace 프로테아제, 콜라게나제, Nia 프로테아제, 폴리오바이러스 2Apro 프로테아제, 폴리오바이러스 3C 프로테아제, 게네나제(genenase), 푸린, 엘라스타제, 프로테이나제 K, 펩신, 레닌(키모신), 미생물 아스파르트산 프로테아제, 파파인, 칼파인, 키모파파인, 피신(피카인), 브로멜라인(브로멜라제), 카테스피신 B, 카스파제, 서몰리신, 엔도프로테아제 Arg-C, 엔도프로테아제 Glu-C, 엔도프로테아제 Lys-C, 칼리크레인, 및 플라스민을 포함한다.

[0303] 용어 "동일한" 및 "동일성" 퍼센트는, 둘 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련해서, 이후 설명된 서열 비교 알고리즘이나 육안검사 중 하나에 의해 측정하여 최대 상응도로 비교 및 정렬되었을 때, 동일한 둘 이상의 서열 또는 하위서열, 또는 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 특정 퍼센트 존재하는 둘 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열을 말한다.

[0304] 문구 "실질적으로 상동성" 또는 "실질적으로 동일한"은, 2개의 핵산 또는 폴리펩티드와 관련해서, 이후 설명된 서열 비교 알고리즘이나 육안검사 중 하나에 의해 측정하여 최대 상응도로 비교 및 정렬되었을 때, 일반적으로 둘 이상의 서열 또는 하위서열이 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 것을 말한다. 특정 구체예에서, 실질적인 상동성 또는 동일성은 적어도 약 25, 50, 100 또는 150개 잔기 길이의 서열 영역에 걸쳐서 존재한다. 다른 구체예에서, 서열들은 비교 생물중합체들 중 어느 하나 또는 둘 모두의 전체 길이에 걸쳐서 실질적으로 상동성이거나 또는 동일하다.

[0305] 서열 비교에서, 전형적으로 한 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서 사용된다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 서열과 기준 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요하다면 하위서열 좌표가 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 변수들이 지정된다. 다음에, 서열 비교 알고리즘이 지정된 프로그램 변수들에 기초하여 기준 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0306] 비교를 위한 서열의 최적 정렬이, 예를 들어 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482(1981)의 국소 상동성 알고리즘; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443(1970)의 상동성 정렬 알고리즘; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444(1988)의 유사성 탐색법; 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행 프로그램(GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA; 위스콘신 제네틱스 소프트웨어패키지, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI); 또는 육안검사에 의해서 수행될 수 있다. 유용한 알고리즘의 한 예는 PILEUP인데, 이것은 Feng & Doolittle, J. Mol. Evol., 35:351-360(1987)의 점진적 알고리즘법을 단순화하여 사용하며, Higgins & Sharp, CABIOS, 5:151-153(1989)에 설명된 방법과 유사하다. 서열의 다중 정렬을 생성하는데 유용한 또 다른 알고리즘은 Clustal W이다(Thompson *et al.*, Nucleic Acids Research, 22:4673-4680(1994)). 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 알고리즘이다(Altschul *et al.*, 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)). BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국가 생물기술 정보 센터를 통해 공개적으로 이용할 수 있다.

[0307] 두 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 실질적으로 상동성이거나 동일하다는 추가의 징표는 하기 설명된 대로 제 1 핵산에 의해 암호화된 폴리펩티드가 제 2 핵산에 의해 암호화된 폴리펩티드와 면역학적으로 교차 반응성이라는 것이다. 따라서, 폴리펩티드는 전형적으로 제 2 폴리펩티드와 실질적으로 동일한데, 예를 들어 이 경우 두 폴리펩티드는 보존성 치환에서만 다르다. 두 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 징표는 본원에 설명된 대

로 긴축 조건에서 두 분자가 서로 혼성화한다는 것이다.

[0308] "실질적으로 순수한" 또는 "분리된"은 대상 종이 지배적으로 존재하는 종들이라는 의미이며(즉, 몰 기준으로, 조성물 중에 다른 개별적 거대분자 종들보다 더 풍부하게 존재한다), 실질적으로 순수한 분획은 대상 종이 존재하는 모든 거대분자 종들 중 적어도 약 50%(몰 기준)를 차지하는 조성물이다. 한 구체예에서, 실질적으로 순수한 조성물은 관심의 종이 몰 또는 중량 기준으로 조성물에 존재하는 거대분자 종들 중 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상을 차지한다는 의미이다. 조성물이 본질적으로 단일 거대분자 종들로 구성된다면 대상 종은 본질적인 동종성까지 정제된 것이다(종래의 검출법에 의해서는 조성물에서 오염 종이 검출될 수 없다). 용매 종들, 소 분자(<500 달톤), 안정제(예를 들어, BSA), 및 원소 이온 종들은 이 정의의 취지에 있어서는 거대분자 종들로 고려되지 않는다. 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 실질적으로 순수하거나 분리된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 이들의 제조에 사용된 거대분자 출발 물질과 관련하여 실질적으로 순수하거나 분리된다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제와, 그리고 선택적으로는 또 다른 생물학적 활성제와 혼합된 실질적으로 순수한 또는 분리된 CNP 변이체를 포함한다.

[0309] "자연 발생"은, 어떤 대상에 적용되었을 때, 그 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 말한다. 예를 들어, 유기체(바이러스를 포함하는)에 존재하고, 실험실에서 사람에 의해 의도적으로 변형되지 않은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 자연 발생한 것이다. 한 구체예에서, "자연 발생" 객체는 사람 기원의 것이다.

[0310] "야생형"(wt)은 종들에 존재하는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 서열을 포함하는 천연 형태를 말하는 용어이다. 야생형 형태는 유전자 돌연변이(들)로부터 생기는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 돌연변이체 형태와는 구별된다.

[0311] 한 구체예에서, 제 2 폴리펩티드의 "유사체" 또는 "변이체" 또는 "유도체"인 제 1 폴리펩티드는 제 2 폴리펩티드와 약 50%, 60% 또는 70% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드이다. 이러한 유사체, 변이체 또는 유도체는 제한은 아니지만, 호모아르기닌, 오르니틴, 페니실라민 및 노르발린을 포함하는 자연 발생이 아닌 아미노산 잔기뿐만 아니라, 자연 발생 아미노산 잔기들로 이루어질 수 있다. 이러한 유사체, 변이체 또는 유도체는 또한 하나 또는 복수의 D-아미노산 잔기로 이루어질 수 있고, 또한 둘 이상의 아미노산 잔기 또는 펩티드의태체 잔기 사이의 비-펩티드 결합과 같은 펩티드의태체 또는 펩티드 결합 동배체를 함유할 수 있다. 다른 구체예에서, 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드의 기지의 절단 산물이 아니거나, 또는 제 2 폴리펩티드의 기지의 전구체가 아니라면, 심지어 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드와 100% 서열 상동성을 갖거나, 또는 야생형 서열을 가진 경우라도, 제 1 폴리펩티드는 제 2 폴리펩티드와 "유사체", "변이체" 또는 "유도체"라고 한다.

[0312] 한 구체예에서, 본원에서 사용된 용어 "로부터 유도된"은 야생형 또는 자연 발생 폴리펩티드 또는 펩티드 서열에 기초한 폴리펩티드 또는 펩티드를 말하며, 천연 아미노산, 비천연 아미노산 또는 펩티드의태체에 의한 하나 이상의 결실, 부가 및/또는 치환을 가질 수 있다. 한 구체예에서, 유도체 서열은 야생형 또는 자연 발생 서열과 약 40%, 50%, 60% 또는 70% 이상, 100% 미만의 서열 유사성을 공유한다. 다른 구체예에서, 유도체는 폴리펩티드의 단편일 수 있으며, 이때 단편은 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개 아미노산 길이에 걸쳐서 야생형 폴리펩티드와 실질적으로 상동성이다. 또 다른 구체예에서, 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드에 존재하지 않는 부분이 폴리펩티드에 직접 또는 간접적으로 부착되어 있다면, 심지어 두 폴리펩티드가 그들의 아미노산 서열에 있어서 100% 상동성을 공유하는 경우에도, 해당 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드"로부터 유래된" 것이다.

[0313] 본원에서 사용된 "NPPC-유래된" 폴리펩티드는 나트륨이뇨 펩티드 전구체 C(NPPC) 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드를 말하며, 이것은 단쇄 126-아미노산 프레-프로 폴리펩티드로서, 절단에 의해서 궁극적으로 wtCNP22가 생기게 된다. NPPC로부터 신호 펩티드의 제거는 pro-CNP를 생성하고, 엔도프로테아제 푸린에 의한 추가의 절단은 활성 53-아미노산 펩티드(CNP-53)을 생성하는데, 이것은 미지의 효소에 의해 분비되고 다시 절단되어 성숙한 22-아미노산 펩티드(CNP, 또는 CNP-22)를 생산한다. 따라서, CNP22 자체는 NPPC로부터 유래되므로 "NPPC-유래된" 폴리펩티드이다. 한 구체예에서, NPPC-유래된 폴리펩티드는 동일한 수의 아미노산 잔기에 걸쳐서 야생형 NPPC와 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 상동성이다. NPPC-유래된 펩티드는 NPPC 폴리펩티드의 약 1 내지 약 53, 또는 1 내지 37, 또는 1 내지 35, 또는 1 내지 31, 또는 1 내지 27, 또는 1 내지 22, 또는 10 내지 35, 또는 약 15 내지 약 37개의 잔기를 포함할 수 있다는 것이 더 고려된다. 한 구체예에서, NPPC-유래된 펩티드는 NPPC 폴리펩티드로부터 유래된 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, 또는 53개 아미노산의 서열을 포함할 수 있다.

[0314] 용어 "유효량"은 대상의 건강 상태, 병리상태 또는 질환에 대한, 또는 진단 목적에 있어서 바람직한 결과를 생산하기에 충분한 투약량을 의미한다. 바람직한 결과는 투약량을 받는 대상에 있어서의 주관적인 또는 객관적인 개선을 포함할 수 있다. "치료적 유효량"은 건강에 대한 의도된 유익한 효과를 생산하기에 효과적인 제제의 양을 말한다. 각 사례별로 적합한 "유효"량은 통상의 실험을 통해서 당업자에 의해 결정될 수 있다. 어떤 특정 환자를 위한 특정한 용량 수준 및 투약 빈도는 변화될 수 있으며, 사용된 특정 화합물의 활성; 생체이용률, 대사 안정성, 해당 화합물의 분비 속도 및 작용 길이; 화합물 투여 방식 및 시간; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강상태, 성별, 및 식이상태; 및 특정 상태의 중증도를 포함하는 다양한 요인들에 좌우될 것이다.

[0315] "치료"는 예방목적 치료 또는 치료목적 치료 또는 진단목적 치료를 말한다. 특정 구체예에서, "치료"는 치료목적, 예방목적 또는 진단목적을 위해 대상에 화합물 또는 조성물을 투여하는 것을 말한다.

[0316] "예방목적" 치료제는 병리상태가 발생할 위험을 감소시킬 목적으로 질환의 징후를 나타내지 않거나, 또는 조기 질환 징후만을 나타내는 대상에게 투여되는 치료제이다. 본 발명의 화합물 또는 조성물은 병리상태가 발생할 가능성을 감소시키거나, 또는 만일 발생한 경우라면 병리상태의 중증도를 최소화하기 위하여 예방적 치료제로서 제공될 수 있다.

[0317] "치료목적" 치료제는 병리상태의 징후 또는 증상을 감소 또는 제거할 목적으로 병리상태의 징후 또는 증상을 나타내는 대상에게 투여되는 치료제이다. 징후 또는 증상은 생화학적, 세포성, 조직학적, 기능적 또는 신체적, 주관적 또는 객관적일 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 치료목적 치료제로서, 또는 진단을 위해서 제공될 수 있다.

[0318] "진단"은 병리학적 상태의 존재, 범위 및/또는 성질을 확인하는 것을 의미한다. 진단 방법들은 특이성 및 선택성에 차이가 있다. 특정 진단 방법은 어떤 상태의 명확한 진단을 제공할 수 없어도, 그 방법이 진단에 도움이 되는 명확한 징표를 제공한다면 그것은 충분하다.

[0319] "뼈- 또는 연골-관련 생체마커" 또는 "뼈- 또는 연골-관련 마커"는, 예를 들어 연골 턴오버(turnover), 연골 형성, 연골 성장, 뼈 재흡수, 뼈 형성, 뼈 성장, 또는 이들의 조합과 관련해서 수준이 증가하거나 감소하는 성장 인자, 효소, 단백질, 또는 다른 검출가능한 생물학적 물질 또는 부분을 말한다. 이러한 생체마커는 본원에 설명된 CNP 변이체의 투여 전에, 동안에 및/또는 후에 측정될 수 있다. 뼈- 또는 연골-관련 생체마커의 예는 제한은 아니지만, CNP, cGMP, II형 콜라겐의 프로펩티드 및 그것의 단편, II형 콜라겐 및 그것의 단편, I형 콜라겐의 프로펩티드 및 그것의 단편, I형 콜라겐 및 그것의 단편, 오스테오칼신, 증식성 세포핵 항원(PCNA), 아그레칸 콘드로이틴 술페이트, 및 알칼리성 포스파타제를 포함한다. 연골- 및 뼈-관련 생체마커는, 제한은 아니지만 조직, 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 활액막액 및 소변을 포함하는 어떤 적합한 생물학적 샘플에서 측정될 수 있다. 어떤 구체예에서, 생체마커는 효능/약동태학 생체내 연구가 수행된 동물의 혈액, 혈장 또는 혈청에서 및/또는 생체외 연구의 컨디셔닝 배지로부터 측정된다.

[0320] 특정 구체예에서, 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 생체마커의 수준이 측정되고, 대상에게 투여되는 CNP 변이체의 투여량 및 투여 빈도는 측정된 생체마커 수준에 따라서 조정될 수 있다. 어떤 구체예에서, 생체마커의 수준은 "표적 수준 이하"이거나, 또는 "표적 수준 이상"이다. 생체마커의 표적 수준은 CNP 변이체를 받은 대상에서 치료 효과가 관찰되는 생체마커의 수준 또는 수준의 범위이다. 특정 구체예에서, CNP-반응성 질병 또는 상태를 가진 대상에서 생체마커의 표적 수준은 병에 걸리지 않은 정상 대상에서 관찰된 생체마커의 수준 또는 수준 범위이다. 다른 구체예에서, 치료 효과를 표시하기 위해서, 생체마커의 표적 수준이 정상 대상에서 관찰된 생체 마커의 수준 또는 수준 범위와 반드시 동등할 필요는 없으며, 병에 걸리지 않은 대상에서 관찰된 생체 마커의 "정상" 수준 또는 수준 범위의, 예를 들어 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 이내일 수 있다.

[0321] 예를 들어, 생체마커의 수준이 뼈 또는 연골 형성이나 성장과 관련해서 증가한다면, 치료 효과를 표시하는 생체마커의 표적 수준은 CNP 변이체가 투여된 적이 없는 CNP-반응성 질병에 걸린 환자에서의 생체마커의 수준보다 높을 수 있고, 선택적으로 해당 질병에 걸리지 않은 대상에서의 생체마커의 "정상" 수준(들)보다는 낮거나, 약 "정상" 수준(들)이거나, 또는 "정상" 수준(들) 이상일 수 있다. 한 구체예에서, 생체마커의 수준이 표적 수준 이하인 경우, 그것은 불충분한 치료 효과를 표시하며, 투여되는 CNP 변이체의 투여량 또는 투여 빈도를 증가시킬 필요가 있다. 관련된 구체예에서, 생체마커가 표적 수준 이상인 경우, 그것은 필요한 것보다 많은 CNP 변이체가 투여되었음을 나타내며, 투여되는 CNP 변이체의 투여량 또는 투여 빈도를 감소시킬 필요가 있다.

[0322] 다른 예로서, 생체마커의 수준이 뼈 또는 연골 형성이나 성장과 관련해서 감소할 경우, 치료 효과를 표시하는 생체마커의 표적 수준은 CNP 변이체가 투여된 적이 없는 CNP-반응성 질병에 걸린 환자에서의 생체마커의 수준보다 낮을 수 있고, 선택적으로 해당 질병에 걸리지 않은 대상에서의 생체마커의 "정상" 수준(들)보다 높거나, 약 "정상" 수준(들)이거나, 또는 "정상" 수준(들) 이하일 수 있다. 이러한 경우, CNP 변이체의 투여량 및 투여 빈도에 있어서 상기 언급된 조정을 반대로 적용할 수 있다.

[0323] "제약 조성물"은 사람 및 동물을 포함하는 대상 동물에서의 제약학적 사용에 적합한 조성물을 말한다. 제약 조성물은 CNP 변이체의 치료적 유효량, 선택적으로 다른 생물학적 활성제, 및 선택적으로 제약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 포함한다. 한 구체예에서, 제약 조성물은 활성 성분(들), 및 담체로 구성되는 불활성 성분(들), 뿐만 아니라 간접적으로 또는 직접적으로 이 원료들 중 어떤 둘 이상의 조합, 복합체화 또는 응집으로 인해서 생기는, 또는 이 원료들 중 하나 이상의 다른 타입의 반응 또는 상호작용으로 인해서 생기는 어떤 산물을 포함하는 조성물을 포함한다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 화합물과 제약학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 혼합함으로써 제조된 어떤 조성물을 포함한다.

[0324] "제약학적으로 허용되는 담체"는 표준 제약 담체, 버퍼 등을 말하며, 예를 들어 인산염 완충 식염수 용액, 5% 덱스트로스 수용액, 및 에멀젼(예를 들어, 오일/물 또는 물/오일 에멀젼)이 있다. 부형제의 비제한적 예는 애쥬번트, 바인더, 필러, 희석제, 붕해제, 유화제, 습윤제, 윤활제, 활택제, 감미제, 향미제 및 착색제를 포함한다. 적합한 제약 담체, 부형제 및 희석제는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed.(Mack Publishing Co., Easton, 1995)에 설명된다. 바람직한 제약 담체는 활성제의 의도된 투여 방식에 의존한다. 전형적인 투여 방식은 장내(예를 들어, 경구) 또는 비경구(예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 복강내 주사; 또는 국소, 경피 또는 경점막 투여) 투여를 포함한다.

[0325] "제약학적으로 허용되는 염"은 제한은 아니지만, 금속(예를 들어, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등)염 및 암모니아 또는 유기아민의 염들을 포함하여, 제약 용도에 사용되는 화합물로 제제화될 수 있는 염이다.

[0326] "제약학적으로 허용되는" 또는 "약물학적으로 허용되는"은 생물학적으로 또는 다른 식으로 바람직하지 않지 않은 물질, 즉 이 물질이 어떤 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키거나, 또는 그것이 함유된 조성물 중의 성분이나 대상의 신체 상에 또는 체내에 존재하는 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않고 대상에 투여될 수 있다는 것이다.

[0327] 용어 "단위 제형"은 사람 및 동물 대상 위한 단위 투약량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 말하며, 각 단위는 본 발명의 화합물을, 선택적으로 제약학적으로 허용되는 부형제, 희석제, 담체 또는 비히클과 함께, 원하는 효과를 생산하기에 충분한 양으로 계산된 정해진 양을 함유한다. 본 발명의 신규 단위 제형의 구체적인 사항은 사용된 특정 화합물 및 달성되는 효과, 그리고 숙주에서 각 화합물과 관련된 약물역학에 좌우된다.

[0328] "생리학적 조건"은 동물(예를 들어, 사람)의 체내 상태를 말한다. 생리학적 조건은 제한은 아니지만, 체온 및 생리학적 이온 강도의 수성 환경, pH 및 효소를 포함한다. 생리학적 조건은 또한 대부분의 대상에 존재하는 "정상" 조건과는 다른 특정 대상의 체내 상태를 포함하며, 이것은 약 37℃의 정상 사람 체온과 상이하거나, 또는 약 7.4의 정상 사람 혈액 pH와 상이한 조건이다.

[0329] "생리학적 pH" 또는 "생리학적 범위의 pH"는 약 7.0 내지 8.0의 범위, 더 전형적으로는 약 7.2 내지 7.6의 범위의 pH를 의미한다.

[0330] 본원에서 사용된 용어 "대상"는 포유류 및 비-포유류를 포함한다. 포유류의 예는 제한은 아니지만, 포유동물 부류의 구성원, 즉 사람, 비-사람 영장류, 예를 들어 침팬지, 및 다른 꼬리 없는 원숭이 및 꼬리 달린 원숭이 종들; 소, 말, 양, 염소, 돼지와 같은 가축들; 토끼, 개 및 고양이와 같은 애완동물들; 설치류를 포함하는 실험실 동물들, 예를 들어 래트, 마우스 및 기니피그 등을 포함한다. 비-포유류의 예는 제한은 아니지만, 조류, 어류 등을 포함한다. 이 용어는 특정 연령이나 성별을 표시하지는 않는다.

[0331] 용어 "폴리에틸렌 글리콜", "PEG", "폴리에틸렌 옥시드" 및 "PEO"는 다른 언급이 없다면 본원에서 호환하여 사용된다. n의 수와 관련된 "PEG" 중합체에 아미노기를 통해 콘쥬게이트된 CNP 펩티드(CNP22 또는 그것의 변이체)는 일반적으로 식 CH_3-[-O-CH_2CH_2-]n-C(=O)NHR를 가지며, 여기서 n은 에틸렌 옥시드 단위의 수이고, R은 펩티드의 나머지 부분을 표시한다. "PEO" 중합체는 선택적으로 카르보닐 탄소와 에틸렌 옥시드 반복 단위 사이에 알킬렌 기(CH_2)m를 가질 수 있으며, 여기서 m은 1 내지 5의 정수이다. 이러한 "PEOn"(예를 들어, PEO12 또는 PEO24) 중합체는 단분산성으로서, 특정 분자량을 가진 하나의 분리된 중합체이다. 유사하게, nK의 수와 관

련된 "PEGnK" 중합체에 아미노기를 통해 콘쥬게이트된 CNP 펩티드는 일반적으로 CH_3-[-O-CH_2CH_2-]p-C(=O)NHR을 가지며, 여기서 p는 1을 초과하는 정수이다. "PEGnK" 중합체도 역시 선택적으로 카르보닐 탄소와 반복되는 에틸렌 옥시드 반복 단위 사이에 알킬렌 기(CH_2)m를 가질 수 있으며, 여기서 m은 1 내지 5의 정수이다. 그러나, 이러한 "PEGnK"(예를 들어, PEG1K, PEG2K, PEG5K 또는 PEG20K) 중합체는 다분산성으로서, 분자량 분포를 갖는 중합체들의 혼합물을 함유하며, 이때 nK의 수는 킬로 달톤 단위의 중합체 수-평균 분자량(Mn)을 표시한다. 예를 들어, CNP 펩티드에 콘쥬게이트된 "PEG2K"는 약 2kDa의 중합체 수-평균 분자량을 갖는 다분산성 PEG 중합체를 표시한다.

[0332] 중합체(예를 들어, PEG)의 질량 범위가 주어졌을 때(예를 들어, kDa 단위), 명백히 다른 의미가 언급되지 않는다면, 그 범위는 다분산성 혼합물에 존재하는 다수의 중합체의 분자량 범위가 아니라, 중합체 수-평균 분자량의 범위를 말한다.

[0333] 용어 "할로겐", "할로겐화" 또는 "할로"는 불소, 염소, 브롬 및/또는 요오드를 말한다.

[0334] 용어 "알킬"은 선형 또는 분지형 포화 1가 탄화수소 라디칼을 말하며, 여기서 알킬은 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다. 특정 구체예에서, 알킬은 1 내지 20(C_{1-20}), 1 내지 15(C_{1-15}), 1 내지 12(C_{1-12}), 1 내지 10(C_{1-10}) 또는 1 내지 6(C_{1-6})개의 탄소 원자를 갖는 선형 포화 1가 탄화수소 라디칼이거나, 또는 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 12(C_{3-12}), 3 내지 10(C_{3-10}) 또는 3 내지 6(C_{3-6})개의 탄소 원자를 갖는 분지형 포화 1가 탄화수소 라디칼이다. 본원에서 사용된 선형 C_{1-6} 및 분지형 C_{3-6} 알킬 기는 또한 저급 알킬이라고도 한다. 알킬 기의 예는, 제한은 아니지만 메틸, 에틸, 프로필(n-프로필 및 이소프로필을 포함하여 모든 이성질체를 포함한다), 부틸(n-부틸, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸을 포함하여 모든 이성질체를 포함한다), 펜틸(모든 이성질체를 포함한다), 및 헥실(모든 이성질체를 포함한다)을 포함한다. 예를 들어, C_{1-6} 알킬은 1 내지 6개 탄소 원자의 선형 포화 1가 탄화수소 라디칼, 또는 3 내지 6개 탄소 원자의 분지형 포화 1가 탄화수소 라디칼을 말한다.

[0335] 용어 "알콕시"는 -C-알킬 기를 말한다. 특정 구체예에서, 알콕시 기는 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다.

[0336] 용어 "할로알킬"은 하나 이상의 할로겐화 원자로 치환된 알킬 기를 말한다. 특정 구체예에서, 할로알킬 기는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 할로겐화 원자로 치환된다. 특정 구체예에서, 할로알킬 기는 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 추가 치환체 Q로 치환될 수 있다.

[0337] 용어 "시클로알킬"은 환형 포화 교상 및/또는 비-교상 1가 탄화수소 라디칼을 말하며, 이것은 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다. 특정 구체예에서, 시클로알킬은 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 12(C_{3-12}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 7(C_{3-7})개 탄소 원자를 가진다. 시클로알킬 기의 예는, 제한은 아니지만 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 데칼린일 및 아다만틸을 포함한다.

[0338] 용어 "헤테로시클릴" 또는 "헤테로시클릭"은 적어도 하나의 비-방향족 고리를 함유하는 단환 비-방향족 고리 시스템 또는 다환 고리 시스템을 말하며, 여기서 비-방향족 고리 원자들 중 하나 이상의 O, S, 또는 N으로부터 독립적으로 선택된 헤테로 원자이고, 나머지 비-방향족 고리 원자는 탄소 원자이다. 특정 구체예에서, 헤테로시클릴 또는 헤테로시클릭 기는 3~20, 3~15, 3~10, 3~8, 4~7, 또는 5~6개의 고리 원자를 가진다. 특정 구체예에서, 헤테로시클릴은 단환, 2환, 3환, 또는 4환 고리 시스템이며, 이들은 융합 또는 교상 고리 시스템을 포함할 수 있고, 질소 또는 황 원자가 선택적으로 산화될 수 있으며, 질소 원자는 선택적으로 4차화될 수 있고, 일부 고리는 부분적으로 또는 완전히 포화되거나, 또는 방향족일 수 있다. 헤테로시클릴은 어떤 헤테로 원자 또는 탄소 원자에서 주 구조에 부착되어 안정한 화합물을 생성할 수 있다. 헤테로시클릭 기의 예는, 제한은 아니지만, 아크리딘일(acridinyl), 아제핀일(azepinyl), 벤즈이미다졸릴(benzimidazolyl), 벤즈인돌릴(benzindolyl), 벤조이속사졸릴(benzoisoxazolyl), 벤즈이속사진일(benzisoxazinyl), 벤조디옥산일(benzodioxanyl), 벤조디옥솔릴(benzodioxolyl), 벤조푸라논일(benzofuranonyl), 벤조푸란일(benzofuranyl), 벤조나프토푸란일(benzonaphthofuranyl), 벤조피라논일(benzopyranonyl), 벤조피란일(benzopyranyl), 벤조테트라히드로푸란일(benzotetrahydrofuranyl), 벤조테트라히드로티엔일(benzotetrahydrothienyl), 벤조티아디아졸릴(benzothiadiazolyl), 벤조티아졸릴(benzothiazolyl), 벤조티오펜일(benzothiophenyl), 벤조트리아졸릴(benzotriazolyl), 벤조티오피란일(benzothiopyranyl), 벤족사진일(benzoxazinyl), 벤족사졸릴(benzoxazolyl),

벤조티아졸릴(benzothiazolyl), β-카르볼린일(β-carbolinyl), 카르바졸릴(carbazolyl), 크로만일(chromanyl), 크로몬일(chromonyl), 신놀린일(cinnolinyl), 쿠마린일(coumarinyl), 데카히드로이소퀴놀린일(decahydroisoquinolinyl), 디벤조푸란일(dibenzofuranyl), 디히드로벤즈이소티아진일(dihydrobenzisothiazinyl), 디히드로벤즈이속사진일(dihydrobenzisoxazinyl), 디히드로푸릴(dihydrofuryl), 디히드로피란일(dihydropyranyl), 디옥솔란일(dioxolanyl), 디히드로피라진일(dihydropyrazinyl), 디히드로피리딘일(dihydropyridinyl), 디히드로피라졸릴(dihydropyrazolyl), 디히드로피리미딘일(dihydropyrimidinyl), 디히드로피롤릴(dihydropyrrolyl), 디옥솔란일(dioxolanyl), 1,4-디티안일(1,4-dithianyl), 푸라논일(furanonyl), 푸란일(furanyl), 이미다졸리딘일(imidazolidinyl), 이미다졸린일(imidazolinyl), 이미다졸릴(imidazolyl), 이미다조피리딘일(imidazopyridinyl), 이미다조티아졸릴(imidazothiazolyl), 인다졸릴(indazolyl), 인돌린일(indolinyl), 인돌리진일(indolizinyl), 인돌릴(indolyl), 이소벤조테트라히드로푸란일(isobenzotetrahydrofuranyl), 이소벤조테트라히드로티엔일(isobenzotetrahydrothienyl), 이소벤조티엔일(isobenzothienyl), 이소크로만일(isochromanyl), 이소쿠마린일(isocoumarinyl), 이소인돌린일(isoindolinyl), 이소인돌릴(isoindolyl), 이소퀴놀린일(isoquinolinyl), 이소티아졸리딘일(isothiazolidinyl), 이소티아졸릴(isothiazolyl), 이속사졸리딘일(isoxazolidinyl), 이속사졸릴(isoxazolyl), 모르폴린일(morpholinyl), 나프티리딘일(naphthyridinyl), 옥타히드로인돌릴(octahydroindolyl), 옥타히드로이소인돌릴(octahydroisoindolyl), 옥사디아졸릴(oxadiazolyl), 옥사졸리디논일(oxazolidinonyl), 옥사졸리딘일(oxazolidinyl), 옥사졸로피리딘일(oxazolopyridinyl), 옥사졸릴(oxazolyl), 옥시란일(oxiranyl), 페리미딘일(perimidinyl), 페난트리딘일(phenanthridinyl), 펜안트롤린일(phenathrolinyl), 펜아르사진일(phenarsazinyl), 펜아진일(phenazinyl), 페노티아진일(phenothiazinyl), 펜옥사진일(phenoxazinyl), 프탈라진일(phthalazinyl), 피페라진일(piperazinyl), 피페리딘일(piperidinyl), 4-피페리돈일(piperidonyl), 프테리딘일(pteridinyl), 퓨린일(purinyl), 피라진일(pyrazinyl), 피라졸리딘일(pyrazolidinyl), 피라졸릴(pyrazolyl), 피리다진일(pyridazinyl), 피리딘일(pyridinyl), 피리도피리딘일(pyridopyridinyl), 피리미딘일(pyrimidinyl), 피롤리딘일(pyrrolidinyl), 피롤린일(pyrrolinyl), 피롤릴(pyrrolyl), 퀴나졸린일(quinazolinyl), 퀴놀린일(quinolinyl), 퀴녹살린일(quinoxalinyl), 퀴누클리딘일(quinuclidinyl), 테트라히드로푸릴(tetrahydrofuryl), 테트라히드로푸란일(tetrahydrofuranyl), 테트라히드로이소퀴놀린일(tetrahydroisoquinolinyl), 테트라히드로피란일(tetrahydropyranyl), 테트라히드로티엔일(tetrahydrothienyl), 테트라졸릴(tetrazolyl), 티아디아졸로피리미딘일(thiadiazolopyrimidinyl), 티아디아졸릴(thiadiazolyl), 티아모르폴린일(thiamorpholinyl), 티아졸리딘일(thiazolidinyl), 티아졸릴(thiazolyl), 티엔일(thienyl), 트리아진일(triazinyl), 트리아졸릴(triazolyl), 및 1,3,5-트리티안일(1,3,5-trithianyl)을 포함한다. 특정 구체예에서, 헤테로시클릭 기는 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다.

[0339] 용어 "아릴"은 적어도 하나의 방향족 탄화수소 고리를 함유하는 단환 방향족 기 또는 다환 1가 방향족 기를 말한다. 특정 구체예에서, 아릴은 6-20(C_{6-20}), 6-15(C_{6-15}), 또는 6-10(C_{6-10})개의 고리 원자를 가진다. 아릴 기의 예는, 제한은 아니지만, 페닐(phenyl), 나프틸(naphthyl), 플루오렌일(fluorenyl), 아줄렌일(azulenyl), 안트릴(anthryl), 페난트릴(phenanthryl), 피렌일(pyrenyl), 비페닐(biphenyl), 및 테르펜일(terphenyl)을 포함한다. 또한, 아릴은 2환 또는 3환 탄소 고리를 말하며, 이 경우 고리들 중 적어도 하나는 방향족이고, 나머지는 포화되거나, 부분적으로 불포화되거나, 또는 방향족일 수 있으며, 예를 들어 디히드로나프틸(dihydronaphthyl), 인덴일(indenyl), 인단일(indanyl), 및 테트라히드로나프틸(tetrahydronaphthyl)(tetralinyl)이 있다. 특정 구체예에서, 아릴 기는 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다.

[0340] 용어 "헤테로아릴"은 적어도 하나의 방향족 고리를 함유하는 단환 방향족 기 또는 다환 방향족 기를 말하며, 여기서 적어도 하나의 방향족 고리는 O, S 및 N으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 함유한다. 헤테로 기의 각 고리는 1 또는 2개 O 원자, 1 또는 2개의 S 원자, 및/또는 1~4개의 N 원자를 함유할 수 있으며, 다만 각 고리에서 헤테로 원자의 총수는 4개 이하여야 하고, 각 고리가 적어도 하나의 탄소 원자를 함유해야 한다. 헤테로아릴은 어떤 헤테로 원자 또는 탄소 원자에서 주 구조에 부착되어 안정한 화합물을 생성할 수 있다. 특정 구체예에서, 헤테로아릴은 5~20, 5~15, 또는 5~10개의 고리 원자를 가진다. 단환 헤테로아릴 기의 예는, 제한은 아니지만, 피롤(pyrrolyl), 피라졸릴(pyrazolyl), 피라졸리닐(pyrazolinyl), 이미다졸릴(imidazolyl), 옥사졸릴(oxazolyl), 이속사졸릴(isoxazolyl), 티아졸릴(thiazolyl), 티아디아졸릴(thiadiazolyl), 이소티아졸릴(isothiazolyl), 푸란일(furanyl), 티엔일(thienyl), 옥사디아졸릴(oxadiazolyl), 피리딜(pyridyl), 피라진일(pyrazinyl), 피리미딘일(pyrimidinyl), 피리다진일(pyridazinyl), 및 트리아진일(triazinyl)을 포함한다. 2환 헤테로아릴 기의 예는, 제한은 아니지만, 인돌릴(indolyl), 벤조티아졸릴(benzothiazolyl), 벤족사졸릴(benzoxazolyl), 벤조티엔일(benzothienyl), 퀴놀린일(quinolinyl), 테트라히드로이소퀴놀린일

(tetrahydroisoquinolinyl), 이소퀴놀린일(isoquinolinyl), 벤즈이미다졸릴(benzimidazolyl), 벤조피란일(benzopyranyl), 인돌리진일(indolizinyl), 벤조푸란일(benzofuranyl), 이소벤조푸란일(isobenzofuranyl), 크로몬일(chromonyl), 쿠마린일(coumarinyl), 신놀린일(cinnolinyl), 퀴녹살린일(quinoxalinyl), 인다졸릴(indazolyl), 퓨린일(purinyl), 피롤로피리딘일(pyrrolopyridinyl), 푸로피리딘일(furopyridinyl), 티엔오피리딘일(thienopyridinyl), 디히드로이소인돌릴(dihydroisoindolyl), 및 테트라히드로퀴놀린일(tetrahydroquinolinyl)을 포함한다. 3환 헤테로아릴 기의 예는, 제한은 아니지만, 카르바졸릴(carbazolyl), 벤즈인돌릴(benzindolyl), 페난트롤린일(phenanthrollinyl), 아크리딘일(acridinyl), 페난트리딘일(phenanthridinyl), 및 크산텐일(xanthenyl)을 포함한다. 특정 구체예에서, 헤테로아릴 기는 선택적으로 본원에 설명된 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있다.

[0341] 용어 "선택적으로 치환된"은 알킬, 알콕시, 할로알킬, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 아릴 및 헤테로아릴을 포함하는 기가 하나 이상의 치환체 Q(한 구체예에서, 1, 2, 3 또는 4개 치환체 Q)로 치환될 수 있다는 의미이며, 여기서 각 Q는 독립적으로 시아노, 할로, 옥소, 니트로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-7} 시클로알킬, 헤테로시클릴, C_{6-14} 아릴, 헤테로아릴, $-C(O)R^e$, $-C(O)OR^e$, $-C(O)NR^fR^g$, $-C(NR^e)NR^fR^g$, $-OR^e$, $-OC(O)R^e$, $-OC(O)OR^e$, $-OC(O)NR^fR^g$, $-OC(=NR^e)NR^fR^g$, $-OS(O)R^e$, $-OS(O)_2R^e$, $-OS(O)NR^fR^g$, $-OS(O)_2NR^fR^g$, $-NR^fR^g$, $-NR^eC(O)R^f$, $-NR^eC(O)OR^f$, $-NR^eC(O)NR^fR^g$, $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)R^f$, $-NR^eS(O)_2R^f$, $-NR^eS(O)NR^fR^g$, $-NR^eS(O)_2NR^fR^g$, $-SR^e$, $-S(O)R^e$, $-S(O)_2R^e$, 및 $-S(O)_2NR^fR^g$로 구성되는 군으로부터 선택되고, 각 R^e, R^f, R^g, 및 R^h는 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, C_{3-7} 시클로알킬, 헤테로시클릴, C_{6-14} 아릴, 또는 헤테로아릴이거나; 또는 R^f와 R^g는 이들이 부착된 N과 함께 헤테로시클릴을 형성한다.

[0342] **B. CNP 변이체 (CNP Variants)**

[0343] 치료제로서 CNP22의 용도는 플라스마에서 그것의 짧은 반감기에 의하여 제한된다 (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). 인간 플라스마에서, CNP22의 농도는 전형적으로 5 피코몰(picomolar)보다 낮다. CNP22는 인간의 NEP 또는 NPR-C에 의하여 분해되고 순환계 (circulation)로부터 제거된다 (Growth Hormone & IGF Res., 16: S6-S14). 시스템적으로 투여되는 CNP22를 이용하는 인간과 동물의 연구에 있어서, 지속적인 투입은 상기 대상에서 CNP 22 농도를 증가하기 위하여 사용되곤 하였다. 길어진 반감기와 최소한 동일한 레벨의 기능성을 가지는 CNP 펩티드는 CNP-기반(CNP-based) 치료 계획에 이로울 수 있다. CNP 변이체는 관련된 국제 출원 제PCT/US08/84270호에서 또한 개시되고, 구체적으로 본 발명의 참고문헌에 의하여 포함되었다.

[0344] 본 발명은 NEP 및/또는 NPR-C에 대한 감소된 결합력, NEP에 의한 절단 및/또는 NPR-C에 의한 제거 (clearance)에 대한 감소된 민감성, 그러나 야생형 CNP22와 실질적으로 동일하거나 더 나은 기능성을 가지는 CNP 변이체를 제공한다. NEP에 의한 절단 및/또는 NPR-C에 의한 정화에 대한 CNP 변이체의 감소된 민감성은 상기 변이체의 혈장 또는 혈청 반감기를 증가시킬 수 있고, 따라서 상기 변이체가 목표 조직으로 분배되는 기회를 증가시키고 목표한 약리학적 효과를 유발한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 CNP 변이체는 생체 내 또는 생체외에서 wtCNP22와 비교하여 NEP에 의한 절단 및/또는NPR-C에 의한 정화에 대하여 약 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 또는 5배 감소된 민감성을 가지고, 생체 내에서 wtCNP22와 비교하여 최소한 약 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 또는 5배 증가된 혈장 또는 혈청 반감기를 가지는 반면, wtCNP22와 비교하여 최소한 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는100%의 기능성이 유지되거나, wtCNP22의 기능성보다 최소한 약 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 또는 5배 큰 기능성을 가진다. CNP 기능성은 예를 들어, 생체외 또는 생체 내 연구에서 연골 또는 골의 생성 또는 성장에 관여하는 하나 또는 그 이상의 바이오마커 (예를 들어, cGMP)의 레벨, 생체 외 또는 생체 내 연구에서 특정한 골의 길이 등에 의하여 평가될 수 있다.

[0345] NEP의 천연 기질은 작고, 나트륨이뇨 펩티드 (약 2.2 내지 약 3.2 kDa)는 천연 기질의 최대 크기이다. X선 결정 분석법 (X-ray crystallographic analyses)에 따르면, 상기 NEP 활성 부위는 중앙 구멍 (cavity) 내부에 깊이 묻혀있고, 기질 분자의 크기가 약 3kDa를 넘지 않도록 효과적으로 제한한다 (Oefner et al., J. Mol. Biol., 296: 341-349 (2000)). NPR-B 신호 연구에 기초하여, CNP-17 (CNP22의 사이클릭 도메인인, Cys6-Cys22,만 유지) 및 CNP-53 (N-말단에서 31 아미노산 연장을 가지는 CNP-22)와 같은 CNP22의 변이체는 2.2 kDa wtCNP-22와 유사하게 NPR-B에 결합하고 활성화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 CNP22 또는 그의 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단에서 천연 (예컨대, 펩티드) 및/또는 합성 (예컨대, PEG) 폴리머로 컨쥬게이트된 CNP 변이체를 포함

하고, 이것은 증가된 NEP 저항성을 가지지만 NPR-B 신호 수용체에 결합하고 이를 활성화시키는 능력은 유지된다.

[0346] 일 구현예에서 본 발명은 다음의 일반식에 의하여 표현되는 CNP 변이체를 포함한다:

[0347] (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)(서열번호 139),또는

[0348] (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)(서열번호140), 여기에 있어서:

[0349] (x) 및 (z)는 각각 독립적으로 본 명세서에서 기재한 천연 폴리머 (예를 들어, 최소한 하나의 아미노산을 포함하는 펩티드 시퀀스) 및/또는 합성 폴리머 (예를 들어, PEG)이고, 상기 CNP 변이체의 총질량은 본 명세서에서 일반적으로 기재하는 범위에 의하여 특징되는데, 예를 들면 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa의 범위를 가진다. 일 구현예에서, Cys6 내지 Cys22 잔기는 사이클릭 (cyclic) 부분을 형성한다. 일 구현예에서, (x) 및/또는 (z)는 NPPC 또는 비-CNP 폴리펩티드 (예를 들어, ANP, BNP, IgG 등)로부터 유래된 아미노산 연장(extension)을 포함하고, 여기에 있어서 상기 연장은 1 내지 40, 1 내지 35, 1 내지 31, 5 내지 35, 5 내지 31 또는 5 내지 15개의 아미노산을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22의 다음 포지션 중 하나 또는 그 이상에서 다른 천연 아미노산, 다른 비천연 아미노산, 펩티드 모방체 (peptidomimetic) 및/또는 펩티드 결합 동배체(isosteres)로 하나 이상 변형 및/또는 치환되는 것을 포함한다 : Gly1, Lys4, Gly5, Cys6, Phe7, Gly8, Leu9, Lys10, Leu11, Ile14, Gly15, Ser16, Met17, Gly19, Leu20 and Gly21.

[0350] 다른 구현예에서, 본 명세서에서 일반적으로 기재된 범위에 의하여 특징되는 총질량 범위, 예를 들어 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa, 를 가지고, NEP 분해에 대하여 증가된 저항성을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 다음의 일반식에 의하여 표현된다 :

[0351] (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)(서열번호 141), 또는

[0352] (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)(서열번호 6), 여기에 있어서:

[0353] (x)는 합성 또는 천연의 폴리머릭 그룹, 또는 그의 조합이고, 여기에 있어서 합성 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예는 PEG (또는 PEO)이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예는 1 내지 35 개의 아미노산을 포함하고 NPPC 또는 치환 및/또는 결실된 그의 변이체, ANP, BNP 또는 혈청 알부민, IgG, 히스티딘-리치 당단백질, 피브로넥틴, 피브리노겐, 아연 핑거를 포함하는 폴리펩티드 (zinc finger-containing polypeptides), 오스테오크린 (osteocrin) 또는 피브로블라스트 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)과 같은 다른 비-CNP (폴리)펩티드로부터 유래되고;__

[0354] (z)는 부재하거나 또는 합성 또는 천연 폴리머릭 그룹이거나 또는 그의 조합일 수 있고, 여기에 있어서 합성 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 PEG이고, 천연 폴리머릭 그룹의 비제한적인 예시는 나트륨이뇨 펩티드 (예를 들어, NPPC, CNP, ANP 또는 BNP) 또는 비나트륨이뇨 펩티드 (예를 들어, 혈청 알부민 또는 IgG)로부터 유래된 아미노산 시퀀스일 수 있고;

[0355] (b) 및 (h)는 각각 독립적으로 상기 포지션에서 야생형 Lys이거나 또는 보존성 아미노산 치환 (conservative amino acid substitution) 또는 예컨대, Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신 (6-hydroxy-norleucine), 시트룰린 (citrulline, Cit),Gln, Glu 또는 Ser을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 곁사슬 상에 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 펩티드모방체 또는 다른 천연 또는 비천연 아미노산으로 대체될 수 있다. 일 구현예에서, (b)는 Arg이다. 다른 구현예에서, NEP 저항성을 향상시키기 위하여, (b)는 Gly가 아니다. 또 다른 구현예에서, (h)는 Arg가 아니다.

[0356] NPPC 또는 그 변이체으로부터 유래된 아미노산 시퀀스의 비제한적인 예시는 다음을 포함한다:

[0357] Arg,

[0358] Glu-Arg,

[0359] Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (서열번호 7),

[0360] Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (서열번호 8),

[0361] Gly-Ala-Asn-Pro-Arg (서열번호 9),

[0362] Gly-Ala-Asn-Gln-Gln (서열번호 10),

[0363] Gly-Ala-Asn-Ser-Ser (서열번호 11),

[0364] Gly-Ala-Asn-Arg-Gln (서열번호 12),

[0365] Gly-Ala-Asn-Arg-Met (서열번호 13),

[0366] Gly-Ala-Asn-Arg-Thr (서열번호 14),

[0367] Gly-Ala-Asn-Arg-Ser (서열번호 15),

[0368] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala (서열번호 16),

[0369] Ala-Ala-Trp-Ala-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg (서열번호17),

[0370] Asp-Leu-Arg-Val-Asp-Thr-Lys-Ser-Arg-Ala-Ala-Trp-Ala-Arg (서열번호 18),

[0371] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Lys-Lys (서열번호 19),

[0372] Gln-Glu-His-Pro-Asn-Ala-Arg-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ala-Asn-Arg-Arg (서열번호 20),

[0373] 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 (서열번호 21), 및

[0374] 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 (서열번호 22).

[0375] ANP, BNP, 혈청 알부민 및 IgG와 같은 비-CNP 폴리펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:

[0376] Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser (서열번호 23);

[0377] Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (서열번호 24);

[0378] Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (서열번호 25);

[0379] Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly (서열번호 26);

[0380] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-Tyr (서열번호 27);

[0381] Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His (서열번호 28);

[0382] Gly-Gln-His-Lys-Asp-Asp-Asn-Pro-Asn-Leu-Pro-Arg (서열번호 29);

[0383] Gly-Val-Pro-Gln-Val-Ser-Thr-Ser-Thr (서열번호 30);

[0384] Gly-Glu-Arg-Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg-Leu-Ser-Gln (서열번호 31);

[0385] Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser (서열번호32).

[0386] 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 (x) 및/또는 (z) 그룹을 가지는 상기 CNP 변이체의 N-말단 (x) 그룹 및/또는 C-말단 (z) 그룹은 독립적으로, 만약 가능하다면, 소수의 산성 천연 또는 비천연 아미노산 (예컨대, Asp 또는 Glu)을 포함한다. 다른 구현예에서, CNP22의 pI (pI 8.9)와 유사한 알칼리성의 pI를 유지하기 위하여 염기성의 천연 또는 비천연 아미노산 (예를 들어, Lys, Arg 또는 His)이 (x) 및/또는 (z)에 풍부하다. 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체의 pI는 약 8 내지 약 10.5 범위에 있고, CNP 변이체가 뼈 성장판의 연골세포 (chondrocytes) 주위의 세포외기질 (extracellular matrix)을 따라 더 쉽게 분산될 수 있도록 디자인된다. 구체적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체의 상기 pI는 약 8.5 내지 약 10.5, 또는 약 8.5 내지 약 10, 또는 약 9 내지 약 10이다.

[0387] 또 다른 구현예에서, (x) 및/또는 (z)는 극성의 천연 또는 비천연 아미노산이 풍부하여, 증가된 수용성을 가지

도록 디자인된다. 다른 구현예에서, (x) 및/또는 (z)는, 만약 가능하다면, 작은 수의 소수성 (hydrophobic) 천연 또는 비천연 아미노산 (예를 들어, Ala, Val, Leu, Ile 또는 Met)을 포함한다.

[0388] 추가적인 구현예에서, CNP 변이체의 N-말단은 최소한 하나의 글리신 잔기 (glycine residue)에서 종결되어, 증가된 혈청 반감기를 가지도록 디자인된다. 관련된 구현예에서, 파이로글루타민 (pyroglutamine) 형성을 예방하기 위하여, CNP 변이체의 상기 N-말단은 글루타민 잔기에서 종결되고, 만약 그렇지 않다면 글리신 에서 종결된다. 일 구현예에서, 상기 (x) 그룹은 N-말단이 적어도 하나의 글리신 잔기에서 종결된 아미노산 연장을 포함한다. 다른 구현예에서, (x) 및/또는 (z)는 2개의 인접한 염기성의 천연 또는 비천연 아미노산 (예컨대, Lys-Lys 또는 Arg-Arg)을 포함하지 않아, 프로테아제 퓨린에 의한 절단에 대한 민감성을 감소시키도록 디자인된다. 일 구현예에서, (x)는 CNP22의 Gly1에 대응하는 포지션 바로 앞의 2개의 인접한 염기성 아미노산을 포함하지 않는다.

[0389] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체의 (x) 그룹 및/또는 (z) 그룹은 NPPC로부터 유래된 아미노산 시퀀스 (예컨대, CNP53으로부터 유래된)를 포함한다. 일 구현예에 있어서, (x)는 ANP 또는 BNP의 N-말단 꼬리로부터 유래된 아미노산 시퀀스를 포함한다. 다른 구현예에서, (z)는 ANP 또는 BNP의 C-말단 꼬리로부터 유래된 아미노산 시퀀스를 포함한다. 추가적인 구현예에서 (x) 및/또는 (z)는 예를 들어, IgG, 인간 혈청 알부민 (human serum albumin, HSA), 히스티딘-리치 당단백질 (histidine-rich glycoproteins), 피브로넥틴 (fibronectin), 피브리노겐 (fibrinogen), 아연 핑거 포함 폴리펩티드(zinc finger-containing polypeptides), FGF-2 및 뼈-표적화 단백질 (bone-targeting proteins) (예를 들어, 오스테오크린 (osteocrin), 오스테오폰틴 (osteopontin), 오스테오칼신 (osteocalcin) 및 시알로프로틴 (sialoprotein))과 같은 비나트륨이뇨 폴리펩티드로부터 유래된 아미노산 시퀀스를 포함한다.

[0390] CNP22 또는 그의 변이체의 N-말단 (x) 그룹 및/또는 C-말단 (z) 그룹을 가질 수 있는 CNP22 또는 그의 변이체에 대하여 기재한 구현예에 있어서, (x) 및/또는 (z)는 독립적으로 뼈형성단백질 (bone morphogenetic protein, BMP)의 기능성 도메인으로부터 유래된 아미노산 시퀀스를 포함할 수 있다. BMP의 기능성 도메인으로부터 유래된 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산 연장은, 본 명세서에서 일반적으로 기재된 범위, 예컨대 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa 범위 에 의하여 특징되는 CNP 변이체의 총질량을 증가시켜서, NEP 저항성을 증가시키고 CNP 변이체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 추가적으로, 어떤 BMP들은 뼈 및 연골의 형성을 유도하는 성장인자 및 사이토카인 (cytokine)이기 때문에, BMP의 기능성 도메인으로부터 유래된 단편은 CNP22 또는 그의 변이체의 고리화 도메인에 의한 NPR-B의 구아날릴 사이클라제 기능의 활성화로부터 구별되는 메커니즘에 의하여 연골세포, 연골 또는 뼈 성장을 촉진할 수 있다. 뼈 형성 및 발달, 연골의 형성 및 발달 및/또는 골아세포 (osteoblast) 분화를 촉진하는 BMP들의 비제한적인 예시는 BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 및 BMP8a을 포함한다. 일 구현예에서, CNP22 또는 그 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단은 독립적으로 BMP1, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 또는 BMP8a의 C-말단 부위에서 마지막 140아미노산으로부터 유래된 아미노산 시퀀스로 컨쥬게이트된다.

[0391] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22 또는 CNP17의 N-말단 및/또는 C-말단에서 아미노산 연장을 포함하고, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다 :

[0392] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-53**)(서열번호 4);

[0393] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**CNP-37,AnalogBL**)(서열번호 60);

[0394] AAWARLLQEHPNAGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCA**)(서열번호 61);

[0395] AAWARLLQEHPNARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCB**)(서열번호 62);

[0396] DLRVDTKSRAAWARGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCC**)(서열번호 63);

[0397] RGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 40);

[0398] ERGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 38);

[0399] GANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 64);

[0400] GANRRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 65);

[0401] GANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 66);

[0402] GANSSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 67);

[0403] GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 144); 및

[0404] SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH **(AnalogCD)**(BNP로부터 유래된 N-말단 및 C-말단 꼬리를 포함하는 CNP17)(서열번호 68).

[0405] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22의 포지션 4에서 K4R 치환을 가진다. CNP(K4R) 변이체의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:

[0406] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogAY**)(서열번호 36);

[0407] GANPRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogCI**)(서열번호 37);

[0408] RGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogAZ**)(서열번호 41);

[0409] ERGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogBA**)(서열번호 39);

[0410] GANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogCH**)(서열번호 69);및

[0411] GANSSGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogCG**)(서열번호 70).

[0412] 또 다른 구현예에서, CNP 변이체들은 CNP22, 또는 아미노산 삽입, 결실 및/또는 치환을 갖는 그 변이체와, CNP 펩티드의 N-말단에 붙는, CNP 이외의 폴리펩티드 또는 단백질로부터 유래된 펩티드 단편 또는 비-CNP 폴리펩티드 또는 단백질 전체를 포함하는 키메라이며, 상기 CNP22 또는 그 변이체는 선택적으로 하나 이상의 아미노산 잔기의 N-말단 아미노산 연장을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 상기 CNP 키메라는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 N-말단 아미노산 연장을 포함하는 CNP22 또는 그의 변이체를 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 CNP 키메라는 CNP22 또는 그 변이체의 첫 번째 포지션 (CNP22의 경우 Gly) 바로 앞에 리신-리신 (lysine-lysine (KK)) 잔기 또는 GANKK 잔기를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 CNP 키메라는 CNP22 또는 그 변이체의 첫 번째 포지션 바로 앞에 리신-리신과 다른 하나 또는 둘의 잔기를 포함한다. CNP22 또는 그 변이체의 첫 번째 포지션 바로 앞에 올 수 있는 상기 잔기의 비제한적인 예는 KP, PK, PR, PQ, QK, QQ, RR, SS, GANKP(서열번호 200), GANPK (서열번호 201), GANPR (서열번호 9), GANPQ (서열번호 202), GANQK(서열번호 203), GANQQ (서열번호 10), GANRR (서열번호 8), 및 GANSS (서열번호 11)를 포함한다.

[0413] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP22 및 N-말단 펩티드 단편을 포함하는 키메라이고, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0414] GHHSHEQHPHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCQ**)(히스티딘 리치 당단백질 (HRGP) 단편-CNP22 키메라) (서열번호 76);

[0415] GAHHPHEHDTHGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCR**)(HRGP 단편-CNP22 키메라) (서열번호 77);

[0416] GHHSHEQHPHGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCX**)(HRGP 단편-CNP22 키메라) (서열번호 78);

[0417] GQPREPQVYTLPPSGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCF**)($IgG_1(F_\gamma)$ 단편-CNP22 키메라) (서열번호 79);

[0418] GQHKDDNPNLPRGANPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCY**)(인간 혈청 알부민(HSA) 단편-CNP22 키메라)(서열번호 80);

[0419] GERAFKAWAVARLSQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCE**)(HSA 단편-CNP22 키메라)(서열번호 81);

[0420] FGIPMDRIGRNPRGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCZ**)(오스테오크린 "NPR-C저해제" 단편-CNP22 키메라)(서열번호 82); 및

[0421] GKRTGQYKLGSKTGPGPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogDA**)(FGF2 "헤파린-결합도메인" 단편-CNP22 키메라chimera) (서열번호 83).

[0422] 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 N-말단 단편 및 아르기닌 (arginine)이 CNP22의 Lys4 대신 치환된 CNP22 ("CNP22(K4R)")를 포함하는 키메라이고, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0423] GQPREPQVYTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCK**)

[0424] ($IgG_1(F_\gamma)$ 단편-CNP22(K4R) 키메라) (서열번호 84);

[0425] GVPQVSTSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCL**)

[0426] (HSA 단편-CNP22(K4R)키메라)(서열번호 85);

[0427] GQPSSSSQSTGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCM**) (피브로넥틴 단편-CNP22(K4R)키메라)(서열번호 86);

[0428] GQTHSSGTQSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCN**) (피브로겐 단편-CNP22(K4R) 키메라)(서열번호 87);

[0429] GSTGQWHSESGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCO**)(fibrinogenfragment-CNP22(K4R)chimera)(서열번호 88);및

[0430] GSSSSSSSSSGANQQGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogCP**)(아연 집게 단편-CNP22(K4R)키메라)(서열번호 89).

[0431] IgG 및 CNP22 또는 그의 변이체를 포함하는 키메라는 무엇보다도, NEP 분해에 대한 증가된 저항성 및 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력을 갖도록 디자인된다. HSA의 표면 단편을 포함하는 CNP 키메라는, 무엇보다도, 감소된 면역원성 및 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력을 갖도록 디자인된다. N-말단에서 양이온성, 히스티딘-리치 (histidine-rich), 비-리신 (non-lysine), 비-아르기닌 (non-arginine) 서열을 포함하는 HRGP-CNP22 및 HRGP-CNP22(K4R) 키메라는, 무엇보다도, 프로테아제에 대한 증가된 저항성을 가지도록 디자인된다. 오스테오크린 단편을 포함한 키메라는 프로테아제 (예컨대, 퓨린) 절단시, 뼈 성장판에서 오스테오크린을 방출하도록 디자인되고, 여기에 있어서, 상기 단편은 제거 수용체 NPR-C를 저해할 수 있다. FGF2 헤파린-결합 단편 (FGF2 heparin-binding fragment)을 포함하는 키메라에 있어서, 상기 단편이 결합한 헤파린은 분해로부터 키메라를 보호하도록 디자인되고, 따라서 더 긴 혈청 반감기를 제공한다. 피브로넥틴 (fibronectin), 피브리노겐 (fibrinogen), 또는 아연 집게 (zinc-finger) 단편을 포함한 키메라는 다른 특징 중에서 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력을 위하여 디자인된다.

[0432] 이론에 국한될 의도 없이, wtCNP22와 비교하여 NEP 분해에 대하여 증가된 저항성 및 비슷하거나 향상된 기능성 (예컨대, NPR-B에 대한 결합 및 cGNP 신호의 자극)을 가지는, 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa범위의 분자량을 가지는 CNP 변이체는, 만약 그것이 혈청 알부민 같은 혈장 단백질에 단단히 결합되지 않는다면 더 효율적일 수 있다. 혈장 단백질 (예컨대, 혈청 알부민)에 단단히 결합하지 않는 CNP 변이체는 연골을 따라 분산되고 뼈 성장판의 연골세포에 도달하여 cGMP 신호를 위하여 NPR-B에 결합하여 활성화시키는 데 있어서 더 효율적일 수 있다. 일 구현예에서, 혈장 단백질 (예컨대, 혈청 알부민)에 대하여 감소된 결합력을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 CNP22 또는 그의 변이체 및 IgG의 펩티드 단편을 포함하는 키메라이다. 다른 구현예에서, 혈장 단백질에 대하여 감소된 결합력을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 CNP22 또는 CNP22(K4R) 및 폴리펩티드 (예를 들어, IgG, HSA, 피브로넥틴 (fibronectin), 피브리노겐 (fibrinogen), 아연 핑거 포함 폴리펩티드(zinc finger-containing polypeptide) 등)의 단편을 포함하는 키메라이다. 또 다른 구현예에서, 혈장 단백질에 대하여 감소된 결합력을 가지도록 디자인된 CNP 변이체는 CNP22 또는 친수성 또는 수용성 폴리머에 컨쥬게이트된 그의 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 PEG (또는 PEO)이다. 다른 구현예에서, 상기 친수성 또는 수용성 폴리머 (예를 들어, PEG)는 생리 조건에서 음성 전하를 폴리머에 주는 하나 이상의 작용기, 예컨대 카복실, 설페이트 또는 포스페이트 그룹, 또는 그들의 조합으로 관능화된다.

[0433] 추가적인 구현예에서, 본 발명의 CNP 변이체는 인간 CNP-17 (hCNP-17) 에서 인간 CNP-53 (hCNP-53) 에 이르는 범위의 잘려진 CNP 펩티드를 포함하고, hCNP-53로부터 유래된 야생형 아미노산 시퀀스를 가진다. 상기 잘려진 CNP 펩티드는 다음을 포함한다:

[0434] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

[0435] (CNP-53)(서열번호 4);

[0436] LRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

[0437] (CNP-52)(서열번호 146);

[0438] RVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC

[0439] (CNP-51)(서열번호 147);

[0440] VDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-50) (서열번호 148);

[0441] DTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-49) (서열번호 149);

[0442] TKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-48) (서열번호 150);

[0443] KSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-47) (서열번호 151);

[0444] SRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-46) (서열번호 152);

[0445] RAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-45) (서열번호 153);

[0446] AAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-44) (서열번호154);

[0447] AWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-43) (서열번호155);

[0448] WARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-42) (서열번호 156);

[0449] ARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-41) (서열번호 157);

[0450] RLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-40) (서열번호 158);

[0451] LLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-39) (서열번호 159);

[0452] LQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-38) (서열번호 160);

[0453] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-37) (서열번호 60);

[0454] EHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-36) (서열번호 161);

[0455] HPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-35) (서열번호 162);

[0456] PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-34) (서열번호 163);

[0457] NARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-33) (서열번호 164);

[0458] ARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-32) (서열번호 165);

[0459] RKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-31) (서열번호 166);

[0460] KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-30) (서열번호 167);

[0461] YKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-29) (서열번호 168);

[0462] KGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-28) (서열번호 169);

[0463] GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-27) (서열번호 170);

[0464] ANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-26) (서열번호 171);

[0465] NKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-25) (서열번호 172);

[0466] KKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-24) (서열번호 173);

[0467] KGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-23) (서열번호 174);

[0468] GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-22) (서열번호 1);

[0469] LSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-21) (서열번호 175);

[0470] SKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-20) (서열번호 176);

[0471] KGCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-19) (서열번호 177);

[0472] GCFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-18) (서열번호 178); 및

[0473] CFGLKLDRIGSMSGLGC (CNP-17) (서열번호 2).

[0474] 어떤 구현예에서, CNP 변이체는 CNP-17, CNP-22 또는 CNP-53를 포함하지 않는다.

[0475] 다른 구현예에서, hCNP-17 내지 hCNP-53 범위의 잘려진 상기 CNP 펩티드는, 본 명세서에서 기재한 바와 같이, 특정 부분이 잘려진 CNP 펩티드의 아미노산 포지션 중 하나 또는 그 이상에서, 천연 또는 비천연 아미노산(들) 또는 펩티드모방체(들)(예컨대, 펩티드 결합 동배체)로 아미노산 삽입(들), 결실(들) 및/또는 치환(들)되는 것을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 야생형 시퀀스 또는 아미노산 추가(들), 결실(들) 및/또는 치환(들)를 가지는 상기의 잘려진 CNP 펩티드는 N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위에서, 본 명세서에서 기재한 잔기로 컨쥬게

이트될 수 있는데, 상기 잔기는 뼈- 또는 연골-표적화 모이어티 (예를 들어, 비스포스포네이트 (bisphosphonates), 뼈- 또는 연골- 표적화 펩티드 시퀀스 (예를 들어, 폴리Asp, 폴리Glu), 뼈 단백질의 뼈-표적화 도메인으로부터 유래된 펩티드 시퀀스 (예를 들어, 오스테오폰틴, 오스테오칼신, 시알로프로틴), 골형성단백질 (bone morphogenetic proteins) (예를 들어, BMP2, BMP3, BMP5, BMP7, BMP8a)의 기능성 도메인으로부터 유래된 펩티드 시퀀스, 나트륨이뇨 폴리펩티드 (예를 들어, NPPC, ANP, BNP)로부터 유래된 펩티드 시퀀스, 비나트륨이뇨(non-natriuretic) 기원 (예를 들어, 혈청 알부민, IgG, 히스티딘-리치 당단백질, 피브로넥틴, 피브리노겐, 아연 핑거 포함 폴리펩티드, FGF-2, 오스테오크린)의 폴리펩티드로부터 유래된 펩티드 시퀀스, 신정화를 감소시키는 모이어티 (예컨대, 음이온으로 하전된 PEG 모이어티), 친수성 폴리머 (예를 들어, PEG), 탄소화물 (예를 들어, 뼈 성장판의 세포의 표면 상에 있는 수용체에 의하여 인식되는 탄수화물), 소수성 산 (예를 들어, C_5-C_{12}카복실산, 천연 지방산), 인지질 및 그의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 야생형 시퀀스 또는 아미노산 삽입(들), 결실(들) 및/또는 치환(들)을 가지고, 선택적으로 N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위(들) (internal site(s))에서 하나 또는 그 이상의 모이어티로 컨쥬게이트된, 상기의 끝이 잘려진 CNP 펩티드 (truncated CNP peptides)는 본 명세서에서 기재된, 예를 들어, 약 2.6 kDa 또는 2.8 kDa 내지 약 6 내지 7 kDa 범위에 의하여 특징되는, 총질량을 가진다.

[0476] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 CNP37의 유도체이고 이것은 QEHPNARKYKGANKK-CNP22 (서열번호 60)이다. 상기 CNP37 변이체는 CNP37의 37 포지션 중 하나 또는 그 이상의 포지션에서 아미노산 추가(들), 결실(들) 및/또는 천연 또는 비천연 아미노산(들) 또는 펩티드모방체(들)로 치환(들)을 포함한다. CNP22의 넘버링에 기초하여, CNP37로부터 만들어질 수 있는 치환체의 비제한적인 예시는 K4R, G5S, G5R, G8S, K10R, G15S, S16Q, M17N, G19R, 및 그의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 CNP37 유도체는 Met17를 천연 (예를 들어, 아스파라진 (asparagine)) 또는 비천연 아미노산 또는 펩티드모방체로의 치환을 포함하여, 부분적으로 메티오닌의 황 원자의 산화를 피하기 위하여 디자인된다. 다른 구현예에서, 상기 CNP37 변이체는 Lys8, Lys10, Lys14 및/또는 Lys15 (CNP37의 N-말단으로부터의 넘버링에 기초하여)의 비염기성 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드모방체로의 치환을 포함하여 부분적으로 알부민 결합을 감소하기 위하여 디자인된다.

[0477] 아미노산 추가(들), 결실(들) 및/또는 치환(들)에 덧붙여서 또는 대안적으로, 상기 CNP37 유도체는 N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위 (internal site)에서 본 명세서에서 기재된 모이어티들 중 어느 것으로 컨쥬게이션될 수 있는데, 상기 모이어티는 뼈- 또는 연골-표적화 모이어티 (예를 들어, 뼈-표적화 도메인), 신정화를 감소시키는 모이어티 (예를 들어, 음전하로 하전된 PEG 모이어티), 친수성 폴리머 (예를 들어, PEG), 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함하는 아미노산 시퀀스 (예를 들어, 오스테오크린 "NPR-C 저해제 단편" (osteocrin "NPR-C inhibitor" fragment), 탄수화물 (예를 들어, 뼈 성장판의 세포의 표면 상에서 수용체에 의하여 인식되는 탄수화물), 소수성 산 (예를 들어, C_5-C_{12} 카복실산 및 천연 지방산), 및 그들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0478] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는, 퓨린 프로테아제에 대한 생체 내 저항성을 향상시키도록 디자인된, 퓨린 절단 부위 (밑줄그어진)에서 돌연변이(들)/치환(들)을 가지는 변형된 CNP37 펩티드 및/또는 혈장 안정성을 향상시키고 파이로글루타민 형성을 막기 위하여 디자인된, N-말단의 글라이신 (밑줄그어진)을 포함하는 변형된 CNP37이다. 상기 CNP37 변이체는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0479] GQEHPNARKYKGANPKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**An.CS**)(서열번호 71);

[0480] GQEHPNARKYKGANQKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**An.CT**)(서열번호 72);

[0481] GQEHPNARKYKGANQQGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**An.CU**)(서열번호 73);

[0482] GQEHPNARKYKGANKPGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(**An.CW**)(서열번호 74);

[0483] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(Gly-CNP37,**An.DB**)(서열번호 75); 및

[0484] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC(Pro-Gly-CNP37)(서열번호 145).

[0485] 추가적인 구현예에서, 본 발명의 CNP 변이체는 본 명세서에 기재된 융합 단백질 공정에 의하여 생산될 수 있는 CNP 펩티드 및 그의 변이체를 포함한다. 화학적 또는 단백질 가수분해 절단 또는 단백질 자가-절단을 이용하는, 본 명세서에 기재된 융합 단백질 공정에 의하여 생산될 수 있는 CNP 변이체의 비제한적인 예는 다음을 포함한다:

[0486] GDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-wtCNP53) (서열번호 179);

[0487] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-wtCNP37) (서열번호 75);

[0488] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (wtCNP37) (서열번호 60);

[0489] GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (HSA 단편-wtCNP27) (서열번호 144);

[0490] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 36);

[0491] DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP53(M48N)] (서열번호 180);

[0492] GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP37(M32N)] (서열번호181);

[0493] QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP37(M32N)] (서열번호 182);

[0494] GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [HSA-CNP27(M22N)] (서열번호 183);

[0495] GANRRGLSRGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP27(K4,5,9R, M22N)] (서열번호 184);

[0496] PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (프로-wtCNP53) (서열번호 185);

[0497] PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (프로-Gly-wtCNP37) (서열번호145);

[0498] PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (프로-wtCNP37) (서열번호186);

[0499] PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (wtCNP34) (서열번호 187);

[0500] P-GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (프로-HSA-wtCNP27) (서열번호 188);

[0501] PGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 189);

[0502] MDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-wtCNP53) (서열번호 190);

[0503] MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-wtCNP37) (서열번호191);

[0504] MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-wtCNP37) (서열번호192);

[0505] M-GHKSEVAHRFK-GANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-HSA-wtCNP27) (서열번호 193);

[0506] MGANRRGLSRGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Met-CNP27(K4,5,9R)] (서열번호 194).

[0507] hCNP-17 내지 hCNP-53 범위의 잘려진 CNP 펩티드를 포함하고 야생형 시퀀스 또는 아미노산 삽입(들), 결실(들) 및/또는 치환(들)을 가지는 다른 CNP 변이체는, 융합 단백질의 화학적 또는 단백질 가수분해 절단의 원하는 부위가 표적 CNP 변이체 그 자체의 아미노산 시퀀스 내에 존재하지 않는 한, 본 명세서에서 기재한 융합 단백질 공정에 의하여 또한 생산될 수 있다. 비제한적인 예시로서, 본 명세서에서 기재된 상기 융합 단백질 공정이 포름산 절단을 이용하는 잘려진 wtCNP34를 생산하기 위하여 사용될 수 있다.

[0508] 추가적인 구현예에서, 본 명세서에서 기재된, 아스파라진 (asparagine (Asn/N)) 잔기(들) 및/또는 글루타민 (glutamine (Gln/Q)) 잔기(들)을 가지는 어떤 CNP 펩티드 및 CNP 변이체에 대하여, 그것이 야생형 시퀀스를 가지던지 아니면 비천연 아미노산 시퀀스를 가지던지, 어떤 Asn 잔기(들) 및/또는 어떤 Gln 잔기(들)이 독립적으로 어떤 다른 천연 또는 비천연의 아미노산으로 치환, 예컨대 Asn을 Gln으로 보존적 치환하는 것을 포함하여, 치환될 수 있다. 상기 치환(들)은 부분적으로 아스파라진 및/또는 글루타민의 어떤 가능한 탈아미드화 (deamidation)를 최소화하거나 막기 위하여 디자인된다. 어떤 Asn 잔기(들) 및/또는 어떤 Gln 잔기(들)이 독립적으로 어떤 다른 천연 또는 비천연의 아미노산으로 치환, 예컨대 Asn을 Gln으로 보존적 치환한 CNP 펩티드 및 변이체의 비제한적인 예시는 wtCNP34, wtCNP37, Gly-wtCNP37, Pro-wtCNP37, Pro-Gly-wtCNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (서열번호 144), Pro-GHKSEVAHRFK-wtCNP27 (서열번호 188), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 기재한 CNP 펩티드 및 CNP 변이체의 아스파라진 잔기는 글루타민 (glutamine), 아스파틱산 (aspartic acid) 또는 글루타믹산 (glutamic acid)으로 치환되지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 기재한 CNP 펩티드 및 CNP 변이체의 글루타민 잔기는 , 아스파라진 (asparagine), 아스파틱산 (aspartic acid) 또는 글루타믹산 (glutamic acid)으로 치환되지 않는다. 비제한적인 예로서, Pro-Gly-wtCNP37 (PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 145)의 아스파라진 7 및/또는 15 잔기는, 상기 아스파라진 잔기가 아스파틱 산 또는 이소아스파틱 산으로 디

아민화되는 가능성을 피하기 위하여 독립적으로, 글루타민을 포함하는, 어떤 다른 천연 또는 비천연의 아미노산으로 치환될 수 있다. 어떤 구현예에서, Pro-Gly-wtCNP37의 아스파라진 잔기 7 및/또는 15는 글루타민, 아스파틱 산 또는 글루타믹 산으로 치환되지 않는다.

[0509] 그러나, 본 발명은 탈아민화 또는 탈아민-유사 반응 (예를 들어, 이성질체화 (isomerization))에 민감한 하나 또는 그 이상의, 전체에 이르는, 잔기가 탈아민화 또는 탈아민화- 유사 반응을 통하여, 변환된 잔기 당 100% 변환에 이르는 정도까지 다른 잔기로 변환될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 다음의 CNP 변이체를 포함한다:

[0510] (1) 하나 또는 그 이상, 전체에 이르기까지, 아스파라진 (Asn/N) 잔기는 디아민화를 통하여, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 변환에 이르기까지 아스파틱 산 또는 아스파테이트 (aspartate)로, 및/또는 이소아스파틱 산 또는 이소아스파테이트 (isoaspartate)로 변환될 수 있거나; 또는

[0511] (2) 하나 또는 그 이상, 전체에 이르기까지, 글루타민 (Gln/Q) 잔기는 디아민화를 통하여, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 변환에 이르기까지 글루타민 산 (glutamic acid) 또는 글루타메이트 (glutamate), 및/또는 이소클루타믹 산 (isoglutamic acid) 또는 이소글루타메이트 (isoglutamate)로 변환될 수 있거나; 또는

[0512] (3) 하나 또는 그 이상, 전체에 이르기까지, 아스파틱 산 (aspartic acid) 또는 아스파테이트 (aspartate (Asp/D)) 잔기가 디아민화-유사 반응 (이성질체화라고도 불림)을 통하여, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 변환에 이르기까지 이소아스파틱 산 (isoaspartic acid) 또는 이소아스파테이트 (isoaspartate)로 변환될 수 있거나; 또는

[0513] (4) 하나 또는 그 이상, 전체에 이르기까지, 글루타믹 산 (glutamic acid) 또는 글루타메이트 (glutamate (Glu/E)) 잔기가 디아민화-유사 반응 (이성질체화라고도 불림)을 통하여, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 변환에 이르기까지 이소글루타믹 산 (isoglutamic acid) 또는 이소글루타메이트(isoglutamate)로 변환될 수 있거나; 또는

[0514] (5) 상기의 조합.

[0515] 비제한적인 예시로서, 본 발명은 Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC] (서열번호 145)의 하나 또는 그 이상, 전체에 이르는 아스파라진, 글루타민, 아스파틱 산 및/또는 글루타믹 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), (2) 글루타믹 산/글루타메이트 (glutamic acid/glutamate) 및/또는 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), (3) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (4) 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환이 일어난 CNP 변이체를 포함한다.

[0516] 추가적인 예시로서, 본 발명은 Pro-Gly-wtCNP37 [PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC] (서열번호 145)의 하나 또는 그 이상으로부터 전체에 이르기까지의 아스파라진 및/또는 아스파틱 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (2) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 변환된 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환이 일어난 CNP 변이체를 포함한다.

[0517] 다른 예시로서, 본 발명은 Gly-wtCNP37 [GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 75)]의 하나 또는 그 이상으로부터 전체에 이르기까지의 아스파라진, 글루타민, 아스파틱 산 및/또는 글루타믹 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), (2) 글루타믹 산/글루타메이트 (glutamic acid/glutamate) 및/또는 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), (3) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (4) 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환된 CNP 변이체를 포함한다.

[0518] 또 다른 예시로서, 본 발명은 wtCNP37 [QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 60)]의 하나 또는 그 이상으로부터 전체에 이르기까지 아스파라진, 글루타민, 아스파틱 산 및/또는 글루타믹 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), (2) 글루타믹 산/글루타메이트 (glutamic acid/glutamate) 및/또는 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), (3) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (4) 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환된 CNP 변이체를 포함한다.

[0519] 추가적인 예시로서, 본 발명은 HSA-wtCNP27 키메라, GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 144)의 하나 또는 그 이상으로부터 전체에 이르기까지의 아스파라진, 아스파틱 산, 및/또는 글루타믹 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), (2) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (3) 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환된 CNP 변이체를 포함한다.

[0520] 또 다른 추가적인 예시로서, 본 발명은 Pro-HSA-wtCNP27 키메라, PGHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (서열번호 188)의 하나 또는 그 이상 전체에 이르기까지 아스파라진, 아스파틱 산, 및/또는 글루타믹 산 잔기가 (1) 아스파틱산/아스파테이트 (aspartic acid/aspartate) 및/또는 이소아스파틱 산 /이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), (2) 이소아스파틱 산/이소아스파테이트 (isoaspartic acid/isoaspartate), 및/또는 (3) 이소글루타믹 산/이소글루타메이트 (isoglutamic acid/isoglutamate), 각각으로, 디아민화 또는 디아민화-유사 반응을 통하여, 상기 기재한 것과 같이, 잔기 당 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에 이르도록 변환된 CNP 변이체를 포함한다.

[0521] 추가적으로, 본 발명은 하나 또는 그 이상, 전체에 이르는 메티오닌 잔기 (methionine (Met/M))가, 산화된 잔기마다 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 100%까지의 변형 (transformation)을 보이면서, 어떤 화학적으로 가능한 산화된 형태 (예를 들어, 설폭사이드 (sulfoxide) 및/또는 설폰 (sulfone))로 산화될 수 있는 CNP 변이체에 관한 것이다.

[0522] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 N-말단 및/또는 C-말단에서 세포 막 또는 세포 장벽을 통과하는 그의 변이체의 전좌 (translocation)를 가능하게 하는 모이어티(들)로 컨쥬게이션된, CNP22 또는 그 변이체를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 N-말단 및/또는 C-말단에서 세포 막 또는 세포 장벽을 통과, 활성 펩티드 운반체 (peptide transporter)를 통하여 이루어지는 것을 포함하여 상기 변이체의 운반을 가능하게 하는 펩티드 시퀀스(들)로 컨쥬게이트된다.

[0523] 추가적인 구현예에서, CNP22 또는 그 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단은, 변형된 CNP 펩티드의 총질량을 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위로, 예를 들어, 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa에 이르는 범위로 증가시키기 위하여, 화학적 모이어티, 예를 들어, 천연 및/또는 합성 폴리머로 컨쥬게이트된다. 일 구현예에서, 상기 화학적 모이어티는 생체에 적합한 친수성 또는 수용성의 천연 (예를 들어, 펩티드, 탄수화물) 또는 합성의 (예를 들어, PEG (또는 PEO)) 폴리머이다.

[0524] 구체적인 구현예에서, CNP22 또는 그의 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단은 본 명세서에서 일반적으로 기재된 범위, 예를 들어 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 or 7 kDa,에 의하여 특징되는 총질량을 가지도록 PEG (또는 PEO) 폴리머에 컨쥬게이트된다. CNP22 또는 그 변이체의 페길화 (Pegylation)는, 그 중에서도 신정화 감소 및 프로테아제 저항성 증가에 의하여 면역원성 (immunogenicity)이 감소하고 반감기가 향상되도록 디자인된다. PEG 모이어티는 CNP22 또는, 본 명세서에서 개시된 어떤 변이체, CNP-17 (CNP22의 Cys6-Cys22 고리화 부위), CNP37, 및 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산의 연장(들), 아미노산 치환(들) 및/또는 아미노산 결실(들)을 포함하는, CNP17, CNP22 또는 CNP37 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 변이체의 N-말단 및/또는 C-말단으로 부착될 수 있다. 일 구현예에서, CNP17, CNP22 또는 CNP37 또는 그 변이체의 Lys4 및/또는 Lys10 잔기는 리신 (lysine) 잔기의 어떤 가능한 PEG화 (PEGylation)를 불가능하게 하기 위하여, 곁사슬에 반응성 있는 1차 아민을 포함하지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 (예를 들어, Arg, Gly, Ser, Gln, Glu 또는 Cit) 또는 펩티드모방체로 치환된다. 일 구현예에서, 상기 CNP 펩티드의 Lys4 및/또는 Lys10 잔기는 Arg으로 치환된다. 다른 구현예에서, 상기 Lys10 잔기는 Arg로 치환되지 않는다.

[0525] 추가적인 구현예에서, N-말단에서 PEG (또는 PEO) 모이어티 및 아미노산 연장을 가지는 CNP 변이체 (CNP22 및 그의 변이체)은 CNP22의 Gly1에 대응하는 포지션에 바로 앞의 포지션에 아르기닌을 포함한다. 상기 PEG화 CNP 변이체는 NEP 분해에 대하여 증가된 저항성, 혈청 알부민에 대한 감소된 결합력, 및 증가된 CNP 기능성 (예를 들어, cGMP 신호의 활성화)을 가지도록 디자인된다. PEG화 CNP 변이체의 비제한적인 예시는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), PEO24-GANRR-CNP22(서열번호 36), PEO12-GANRR-CNP22(서열번호 36), PEO24-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), PEO12-GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), PEO24-GANPR-CNP22(서열번호37), PEO12-GANPR-CNP22(서열번호 37), PEO24-GANQQ-CNP22(서열번호 64), PEO12-GANQQ-CNP22(서열번호 64), PEO24-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39), PEO12-ER-CNP22(K4R) (서열번호 39), PEO24-ER-CNP22(서열번호 39), PEO12-ER-CNP22(서열번호 39), PEO24-R-CNP22(K4R) (서열번호 41), PEO12-R-CNP22(K4R) (서열번호 41), PEO24-R-CNP22(서열번호 41), 및 PEO12-R-CNP22(서열번호 41)을 포함하는데, 여기에 있어서 PEO24는 단분산 1.2 kDa PEG 폴리머이고 PEO12는 단분산 0.6 kDa PEG 폴리머이다. 일 구현예에서, 상기 PEG (또는 PEO) 폴리머는 CNP 변이체의 N-말단으로 컨쥬게이트된다.

[0526] 본 발명은 형태 (예를 들어, 호모폴리모 또는 코폴리머; 무작위로, 교차로 또는 블록 코폴리머; 선형 또는 가지 있는; 단분산된 또는 다분산된), 결합 (예를 들어, 아미드, 이민, 아민알, 알킬렌, 또는 에스터 결합과 같이 가수분해 할 수 있거나 안정한 결합), 컨쥬게이션 부위 (예를 들어, N-말단 및/또는 C-말단에서, 바람직하게는 CNP의 고리화 부위의 어떤 잔기에서 (CNP22의 6-22 잔기에 대응하는)) 및 길이 (예를 들어, 약 0.2, 0.4 또는 0.6 kDa 내지 약 2, 3, 4 또는 5 kDa)에 있어서 다를 수 있는 친수성 또는 수용성 폴리머 (예를 들어, PEG)의 용도에 관한 것이다. 상기 친수성 또는 수용성 폴리머는 N-히드록시 숙신이미드 (N-hydroxy succinimide (NHS))계 또는 알데하이드계 화합물 또는 당업계에서 알려진, 다른 화합물을 이용하여 CNP 펩티드로 컨쥬게이트될 수 있다. 상기 CNP 변이체는 예를 들어, wtCNP22 (2.2kDa), wtCNP22의 고리화 부위 (잔기 6-22)만 함유한 CNP17, CNP22 또는 CNP17의 N-말단 및/또는 C-말단에서 아미노산 연장을 가지는 CNP 변이체, 또는 예를 들어 GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36), GANPR-CNP22(K4R) (서열번호 37), R-CNP22(서열번호 40), R-CNP22(K4R) (서열번호 41), ER-CNP22(서열번호 38) 및 ER-CNP22(K4R) (서열번호 39)와 같은 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 가지는 변이체를 이용하여 생성될 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 일반적을 개시된 범위에 의하여 특징되는 총질량 범위, 예컨대 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa를 가지는 상기 PEG-CNP 변이체는 단분산된, NHS- 또는 알데하이드계 화합물을 통하여 N-말단 및/또는 C-말단에서 컨쥬게이트된 선형의 PEG (또는 PEO) 모이어티 또는 NHS계 화합물을 통하여 N-말단 및/또는 C-말단에서 컨쥬게이트된 2개로 가지 친 또는 3개로 가지 친 PEG 모이어티를 포함한다. 본 발명은 또한 감소된 신정화를 가지도록 디자인된 음성 전하의 PEG-CNP 변이체에 관한 것인데, 카복실화 (carboxylated), 설페이트화 (sulfated) 및 포스포릴화 (phosphorylated) 화합물 (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))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서 상기 PEG (또는 PEO) 모이어티는 카복실 (carboxyl) 그룹(들), 설페이트 (sulfate) 그룹(들), 및/또는 포스페이트 (phosphate) 그룹(들)을 포함한다.

[0527] 다른 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 CNP 변이체의 N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위(들)로 컨쥬게이트된 상기 PEG (또를 PEO) 모이어티는 생리적 조건 하에서 양전하로 하전된 하나 또는 그 이상의 작용기를 포함한다. 상기 PEG 모이어티는, 그 중에서도, 상기 PEG화 CNP 변이체의 연골 조직으로의 분배를 향상시키기 위하여 디자인된다. 일 구현예에서, 상기 PEG 모이어티는 하나 또는 그 이상의 일차, 이차 또는 삼차 아미노기, 4차 암모늄기, 및/또는 다른 아민-포함기 (예를 들어, 우레아 (urea))를 포함한다.

[0528] 일 구현예에서, 본 발명은 식$(CH_2CH_2O)_n$의 PEG (또는 PEO)로 NHS계 또는 알다하이드계 화합물을 통하여 컨쥬게이트되는 CNP 22 또는 그 변이체에 관한 것이고, 여기에 있어서, n은 약 6 내지 약 100 사이의 정수이고, 상기 PEG 폴리머는 약 0.3 kDa 내지 약 5 kDa이다. 다른 구현예에서, n은 약 12 내지 약 50 사이의 정수이고, 상기 PEG 폴리머는 약 0.6 kDa 내지 약 2.5 kDa이다. 또 다른 구현예에서, n은 약 12 내지 약 24 사이의 정수이고, 상기 PEG 폴리머는 약 0.6 kDa 내지 약 1.2 kDa이다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 PEG 폴리머의 말단 히드록실기는 비반응성기로 캡핑 (capping)된다. 구체적인 구현예에서, 상기 말단-캡핑기는 알킬기, 예를 들어 메틸과 같은 저급 알킬기이다.

[0529] 추가적인 구현예에서, 본 발명은 중성 엔도펩티다제 (neutral endopeptidase (NEP))를 포함하는 펩티다제에 의한 절단에 대하여 감소된 민감성을 가지는 하나 또는 그 이상의 펩티드 결합 또는 펩티드 결합 동배체 (isosteres)를 가지는 CNP 변이체를 제공한다. NEP는 거대한 소수성 잔기의 아미노 말단에서 기질의 펩티드 결합을 절단하는 막-결합 아연-의존성 엔도펩티다제 (membrane-bound zinc-dependent endopeptidase)이다. 그러

므로, NEP에 대한 절단 부위에서 펩티드 결합의 비천연 펩티드 또는 비펩티드 결합으로의 변형은 NEP 절단의 효과가 없거나 또는 감소되도록 할 수 있다.

[0530] ANP 및 CNP, NEP에 대한 절단은 첫 번째로 고리화 부위 내의 Cys6-Phe7 결합에서 일어나고, 그 후 다른 곳에서 나머지 구조의 절단이 일어나는 것으로 보고된다. BNP에 대하여, 절단은 펩티드 N-말단에서 첫 번째로 일어나고, 그 후 고리화 구조 내에서 일어나는 것으로 보고된다. wtCNP22가 생체외 내에서 2.5분 동안 NEP 소화 (digestion)에 노출되었을 때, 비록 상기 CNP 상의 첫 번째 NEP 절단 부위는 Cys6-Phe7 결합이라고 보고되었더라도, 실시예 2에서 개시한 바와 같이 Cys6-Phe7 및 Gly8-Leu9 펩티드 결합이 가장 가능성이 높긴 하지만 모든 가능한 부위가 예기치 않게 가수분해 되었다.

[0531] NEP의 기질 특이성은 우선적으로 2개의 기질-결합 활성부위 (subsite)인 S1' 및 S2' (Oefner et al., J. Mol. Biol. 296:341-349 (2000))에 의하여 결정된다. 상기 S1'부위는 가수분해에 영향을 받기 쉬운 N-말단 펩티드 결합의 거대하고 소수성인 P1'잔기 (예를 들어, Phe, Leu, Ile 및 Met)를 받아들인다. 상기 S2'부위는 일반적으로 P2'(예를 들어, Gly 또는 Ser)라고 일컬어지는, 더 작은 잔기를 선호한다. CNP에 있어서, Phe7은 NEP S1'부위에 대하여 바람직한 P1'잔기로 보고되는 반면, Gly8은 S2'부위에 대하여 바람직한 P2'잔기이다. 상기 2개의 서브부위는 곁사슬의 특정한 크기만 함께 수용할 수 있고, CNP의 P1'-P2 잔기의 총 크기에서의 증가는 NEP 결합을 방해할 가능성이 있다. 예를 들어, P1'Phe 방향성 고리 (예를 들어, 3-Cl-Phe7)의 3-포지션에서 클로라이드 (chloride) 원자의 삽입는 CNP 및 상기 NEP 절단 부위, 예를 들어 S1'서브 부위, 사이의 상호작용을 변형시킬 (예를 들어, 탈안정화) 가능성이 있다. 3차 부틸기가 더 작은 P2' 잔기 Gly8 (예를 들어, tBu-Gly8)로 삽입되는 것은 CNP 및 상기 S2'서브부위 사이의 상효작용을 방해할 가능성이 있다.

[0532] 이에 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 CNP 변이체는 활성 부위에서 기질을 인식하는 것을 방해하여, NEP 절단에 대한 민감성이 감소시키기 위하여, P1'-P2'잔기, 예를 들어, Phe7-Gly8, 의 크기가 증가된 CNP를 포함한다. 천연 아미노산, 비천연 아미노산 및/또는 펩티드 모방체 모이어티는 Phe7, Leu9, Leu11, Ile14, Met17 및 Leu20을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 하나 또는 그 이상의 거대한 P1'소수성 잔기 대신에, 및/또는 Cys6, Gly8, Gly15, Ser16 및 Gly19을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 하나 또는 그 이상의 더 작은 P2'잔기 대신에 치환될 수 있다.

[0533] 본 발명은 최소한 하나의 변형된 아미노산 및/또는 최소한 하나의 변형된 펩티드 결합, 기질 인식에 개입하는 최소한 하나의 잔기 및/또는 NEP에 의한 절단을 포함하는 CNP 변이체에 관한 것이고, 여기에 있어서 상기 변형된 아미노산 및 변형된 펩티드 결합은 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 펩티드모방체 및/또는 펩티드 결합 동배체일 수 있다. 일 구현예에서, Cys6와 Phe7 사이의 CNP 상의 상기 NEP 절단 부위는 변형된다. 관련된 구현예에서, 상기 Cys6와 Phe7 사이의 펩티드 결합 (-C(=O)-NH-)은 다음의 펩티드 결합 동배체 중의 하나로 대체된다.

[0534] $-CH_2-NH-$,

[0535] -C(=O)-N(R)-, 여기에 있어서 상기 아미드기는 다음의 R 그룹 중의 어떤 기로 알킬화된다 : 메틸 (methyl), 에틸 (ethyl), n-프로필 (n-propyl), 이소프로필 (isopropyl), 사이클로프로필 (cyclopropyl), n-부틸 (n-butyl), 이소부틸 (isobutyl), sec-부틸 (sec-butyl) 또는 tert-부틸 (tert-butyl)이고,

[0536] $-C(=O)-NH-CH_2-$,

[0537] $-CH_2-S-$,

[0538] $-CH_2-S(O)_n-$,상기 n은 1 또는 2이고,

[0539] $-CH_2-CH_2-$,

[0540] -CH=CH-,

[0541] $-C(=O)-CH_2-$,

[0542] -CH(CN)-NH-,

[0543] $-CH(OH)-CH_2-$,

[0544] -O-C(=O)-NH-, 또는

[0545] -NHC(=O)NH-.

[0546] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 다음 구조식으로 표현된다:

[0547] (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)(서열번호 90), 여기에 있어서:

[0548] (x) 및 (z)는 독립적으로, 부존재하거나 또는 예를 들어, 비스포스포네이트 (bisphosphonates) 같은 합성 뼈-표적화 화합물; 폴리Asp 및 폴리Glu와 같이 뼈 또는 연골 표적화에 있어서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴, 오스테오칼신 및 시알로프로틴과 같은 뼈 단백질의 뼈 표적화 도메인으로부터 유래된 아미노산 시퀀스 (Wang et al., Adv. Drug Delivery Rev., 57: 1049-76 (2005)); 음으로 하전된 PEG와 같은 신정화를 감소시키는 폴리머릭 및 비 폴리머릭 분자; 및 천연 폴리머 (예를 들어, 아미노산, 지방산, 및/또는 탄수화물과 같은) 및 CNP 변이체의 총질량을 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위, 예를 들어 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa, 로 증가시킴에 의하여 NEP 분해에 대한 CNP 변이체의 저항성을 증가시키는 합성 폴리머 (예를 들어, PEG)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고;

[0549] (b) 및 (c)는 야생형 Cys6 and Phe7, 다른 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산일 수 있거나, 또는 NEP 절단에 대한 저항성을 증가시키기 위하여 본 발명에서 개시된 것과 같은 펩티드 결합 동배체를 포함할 수 있고; 및

[0550] (d)는 야생형 Gly8일 수 있거나, 또는 더 큰 천연 또는 비천연의 (예를 들어, t-Bu-Gly) 아미노산 또는 NEP에 대한 결합을 감소시키기 위한 펩티드모방체일 수 있다.

[0551] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 (b), (c) 및/또는 (d)에서 최소한 하나의 변형된 아미노산을 포함한다.

[0552] CNP 내의 다른 펩티드 결합은 CNP22 또는 그의 변이체가 Cys6-Phe7에서 Gly8-Leu9, Lys10-Leu11, Arg13-Ile14, Ser16-Met17, 및 Gly19-Leu20 결합을 포함하는 NEP-저항성 펩티드 결합 또는 펩티드 결합 동배체를 가진다고 할지라도 절단될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 Cys6-Phe7 결합에 추가적으로 하나 또는 그 이상의 다른 NEP 절단 부위에서 펩티드 결합 동배체(들)을 가지는 CNP 변이체에 관한 것이고, 여기에 있어서 상기 펩티드 결합 동배체는 본 명세서에서 개시된 것들을 포함한다.

[0553] 다른 구현예에서, 본 발명은 Cys6 및/또는 Cys22에서 호모시스테인 (homocysteine), 페니실 아민 (penicillamine), 2-머캅토 프로피오닉 산 (2-mercaptopropionic acid) 및 3-머캅토 프로피오닉 산 (3-mercaptopropionic acid)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 시스테인 유사체를 포함하는 CNP 변이체에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 야생형 Cys6 또는 그 유사체 및 Cys22 또는 그 유사체 사이의 이황화 결합에 의해 형성된 고리화 도메인을 갖는다.

[0554] 또 다른 구현예에서, CNP22 또는 그의 변이체의 하나 또는 그 이상의 잔기는, 전체 잔기에 이르기까지, D-아미노산으로 치환된다. L-아미노산의 D-아미노산으로의 치환은 그것의 원래 포지션으로부터 상기 곁사슬을 실질적으로 약 120도 (degree)만큼 이동시키고, 이에 따라서 CNP 펩티드의 NEP에 대한 결합을 방해할 가능성이 있다. 구체적인 구현예에서, Phe7의 L-Phe는 그것의 D-이성질체, D-Phe로 치환된다.

[0555] 다른 구현예에서, 3-아미노-2-페닐프로피오닉 산 (3-amino-2-phenylpropionic acid) (또는 2-페닐-베타-알라닌 (2-phenyl-beta-alanine))은 야생형 알파-아미노산 Phe7을 대체한다. 베타-아미노산의 사용은 하나의 메틸렌 유닛 (methylene unit)에 의하여 펩티드 백본 (peptide backbone) 길이를 효율적으로 증가시킨다. 프로테아제 저항성은 기질 형태의 변화 또는 아미노산 곁사슬 사이의 증가된 거리의 결과일 수 있다.

[0556] 비천연 알파-아미노산, 베타-아미노산 또는 펩티드 결합 동배체를 가지는 CNP22의 변이체의 비제한적인 예시는 다음을 포함한다:

[0557] GLSKGC(CH_2NH)FGLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogA**)(서열번호 56),

[0558] GLSKGC-(N-Me-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogB**)(서열번호 57),

[0559] GLSKGC-(D-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogE**)(서열번호 136),

[0560] GLSKGCF-(tBu-Gly)-LKLDRIGSMSGLGC (**AnalogF**)(서열번호 58),

[0561] GLSKGC-(3-Cl-Phe)-GLKLDRIGSMSGLGC (**AnalogG**)(서열번호 137),및

[0562] GLSKGC-[NHCH$_2$CH(Ph)CO]-GLKLDRIGSMSGLGC(**AnalogH**, 3-아미노-2-페닐-프로파노익 산 (3-amino-2-phenyl propionicacid)을 이용하여 형성됨) (서열번호 59).

[0563] 추가적인 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위, 예를 들어 액 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa, 에 의하여 특징되어진 총질량을 가지고, NEP 분해에 대하여 증가된 저항성을 가지도록 디자인되며, 다음 식으로 표현된다:

[0564] (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)(서열번호 46), 여기에 있어서:

[0565] (x) 및 (z)는 독립적으로, 부재하거나 또는 예를 들어, 비스포스포네이트 (bisphosphonates) 같은 합성 뼈-표적화 화합물; 폴리Asp 및 폴리Glu와 같이 뼈 또는 연골 표적화에 있어서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴, 오스테오칼신 및 시알로프로틴과 같은 뼈 단백질의 뼈 표적화 도메인으로부터 유래된 아미노산 시퀀스; 음으로 하전된 PEG와 같은 신정화를 감소사는 폴리머릭 및 비 폴리머릭 모이어티; 및 예를 들어, 아미노산, 소수성산, 및/또는 탄수화물과 같은 폴리머 및 PEG와 같은 합성 친수성 폴리머로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고;

[0566] (a)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환으로 또는 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린(citrulline, Cit), Gln, Ser 또는 Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 곁사슬에 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체로 대체될 수 있다. 일 실시예에 있어서, (a)는 Arg이고;

[0567] (b)는 Cys 및 Cys-CH$_2$-NH와 같은 Cys6 및 Phe7간의 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0568] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉산 (3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체 (N-alkylated derivatives of Phe), 여기에 있어서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸 (methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸 (tert-butyl)이고; 및 Phe 유사체, 여기에 있어서, 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리에서 하나 또는 그 이상의 오쏘- (ortho-), 메타- (meta-), 및/또는 파라- (para-) 포지션은 할로겐 (halogen), 하이드록실 (hydroxyl), 시아노 (cyano), 가지없는 또는 가지 친 C_{1-6} 알킬, 가지없는 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 가지없는 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 (티로신 (tyrosine), 3-클로로페닐알라닌 (3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌 (2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌 (3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸 페닐알라닌 (2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는)로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴 그룹 (1- 및 2-나프틸알라닌(2-naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 헤테로 아릴그룹(피리딜알라닌 (pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine))을 포함하지만 이에 제한되지 않는 헤테로 아릴 그룹으로 치환되는, Phe 유사체로 구성된 군에서 선택되고;

[0569] (d)는 Gly, tert-butyl-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val 및 Asn로 구성된 군에서 선택되고;

[0570] (e)는 Leu, Ser, Thr, 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0571] (f)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나, 또는 보존성 아미노산 치환, 또는 곁사슬 상에서 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는, 예를 들면, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드모방체로 대체될 수 있고, 일 구현예에서 (f)는 Arg가 아니고;

[0572] (g)는 Leu, Asn 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0573] (h)는 Ile, tert-부틸-Gly (tBu-Gly) 및 N-Me-Ile 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0574] (i)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부틸릭 산 (2-aminobutyric acid (Abu)) 및 2-아미노-이소부티릭 산 (2-amino-isobutyric acid (Aib))으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0575] (j)는 Leu, 노르류신 (norleucine (Nle)), 호모류신 (homoleucine (Hleu)), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala),

Ser, Thr, Arg, 및 N-Me-Leu와 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0576] 다른 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위, 예를 들어 약 2.6 또는 2.8 kDa 내지 약 6 또는 7 kDa에 이르는 범위로 특징되어진 총질량을 가지고, NEP 절단에 대하여 증가된 저항성을 가지도록 디자인된, 다음 식으로 표현된다:

[0577] (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)(서열번호 143), 여기에 있어서:

[0578] (x) 및 (z)는 독립적으로 부존재하거나 또는 비스포스포네이트(bisphosphonates)와 같은 합성 골표적화 화합물(synthetic bone-targeting compounds); 폴리Asp 및 폴리Glu와 같은 뼈/연골 표적화 도메인에서 유용한 아미노산 시퀀스; 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin) 및 시알로프로테인(sialoprotein)의 융합 단백질 또는 펩티드 시퀀스와 같은 골 단백질 및 그 유도체의 골표적화 도메인 및 그의 유도체로부터 유래된 아미노산 시퀀스; 하전된 PEG 분자와 같이 친수성 또는 수용성 폴리머를 포함하지만 이에 제한되지 않는 신정화(renal clearance)를 감소하는 모이어티; 및 PEG, 탄수화물, 소수성 산 및/또는 아미노산을 포함하는 모이어티로 구성된 군에서 선택될 수 있고;

[0579] (a)는 상기 포지션에서 야생형 Lys일 수 있거나 또는 보존적 아미노산 치환으로 또는 Arg, Gly, 6-하이드록시-노르류신(6-hydroxy-norleucine), 시트룰린(citrulline, Cit), Gln, Ser 또는 Glu를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 곁사슬에 반응성 있는 1차 아민을 가지지 않는 천연 또는 비천연의 아미노산 또는 펩티드 모방체로 대체될 수 있다. 일 실시예에 있어서, (a)는 Arg이고;

[0580] (b)는 Cys 및 Cys-CH_2-NH와 같은 Cys6 및 Phe7간의 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0581] (c)는 L-Phe; D-Phe; 3-아미노-2-페닐프로피오닉산 (3-amino-2-phenylpropionic acid); Phe의 N-알킬화 유도체(N-alkylated derivatives of Phe), 여기에 있어서, 상기 N-알킬 그룹은 메틸 (methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), 사이클로프로필(cyclopropyl), n-부틸(n-butyl), 이소부틸(isobutyl), sec-부틸(sec-butyl) 또는 tert-부틸 (tert-butyl)이고; 및 Phe 유사체로서, 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리에서 하나 또는 그 이상의 오쏘- (ortho-), 메타- (meta-), 및/또는 파라- (para-) 포지션은 할로겐 (halogen), 하이드록실 (hydroxyl), 시아노 (cyano), 가지없는 또는 가지 친 C_{1-6} 알킬, 가지없는 또는 가지친 C_{1-6} 알콕시, 가지없는 또는 가지친 할로-C_{1-6} 알킬, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 (티로신(tyrosine), 3-클로로페닐알라닌 (3-chlorophenylalanine), 2,3-클로로-페닐알라닌 (2,3-chloro-phenylalanine), 3-클로로-5-플로로-페닐알라닌 (3-chloro-5-fluoro- phenylalanine), 2-클로로-6-플로로-3-메틸 페닐알라닌 (2-chloro-6-fluoro-3-methyl-phenylalanine)를 포함하지만 이에 제한되지 않는)로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 치환체로 치환되거나, 또는 상기 Phe 유사체의 벤젠 고리는 다른 아릴 그룹(1- 및 2-나프틸알라닌(2-naphthylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않음) 또는 헤테로 아릴그룹(피리딜알라닌 (pyridylalanine), 티에닐알라닌(thienylalanine) 및 퓨릴알라닌(furylalanine)을 포함하지만 이에 제한되지 않는)것으로 치환되는, Phe 유사체로 구성된 군에서 선택되고;

[0582] (d)는 Gly, tert-butyl-Gly, Thr, Ser, Val 및 Asn로 구성된 군에서 선택되고;

[0583] (e)는 Leu, Ser, Thr, 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0584] (f)는 Lys, Arg, Gly, 6-히드록시-노르류신 (6-hydroxy-norleucine), 시트룰린 (citrulline (Cit)), Gln 및 Ser로 구성된 군에서 선택되고;

[0585] (g)는 Leu, Asn 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0586] (h)는 Ile, tert-부틸-Gly (tBu-Gly), Asn 및 N-Me-Ile 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택되고;

[0587] (i)는 Gly, Arg, Ser 및 Asn으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0588] (j)는 Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-아미노부티릭 산 (2-aminobutyric acid , Abu) 및 2-아미노-이소부티릭 산 (2-amino-isobutyric acid, Aib)으로 구성된 군에서 선택되고; 및

[0589] (k)는 Leu, 노르류신 (norleucine, Nle), 호모류신 (homoleucine, Hleu), Val, tert-부틸-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser 및 N-Me-Leu 같은 펩티드 결합 동배체로 구성된 군에서 선택된다.

[0590] CNP 변이체의 뼈-관련 질병 (예를 들어, 뼈 이형성증 (skeletal dysplasias))의 표적 부위로의 배달을 향상시키기 위하여, 상기 CNP 변이체는 뼈 또는 연골-표적 모이어티로 (예를 들어, N-말단 및/또는 C-말단에서) 부착될 수 있다. 뼈- 또는 연골- 표적 모이어티의 비제한적인 예시는 비스포스포네이트 (bisphosphonates); 히드록시아파타이트 (hydroxyapatite); 글루코사닌 (glucosarnine); 콜라겐 (collagen) (예를 들어, X형 콜라겐); 폴리Asp; 폴리Glu; 및 오스테오크린, 오스테오폰틴, 오스테오칼신 및 시알로프로틴과 같은 뼈 단백질의 뼈-표적화 도메인으로부터 유래되는 아미노산 시퀀스이다.

[0591] NEP 절단에 대하여 더 낮은 감수성을 가지는 것에 더하여, 상기 CNP 변이체는 CNP의 기능성은 유지하면서, NPR-C 제거 수용체에 대하여 감소된 결합력을 가질 가능성이 있다. NEP-매개 분해뿐만 아니라, CNP22의 반감기는 세포외 NPR-B의 펩티드 결합 도메인에 대하여 58% 시퀀스 상동성을 공유하는, 제거 수용체 (clearance receptor), NPR-C에 의하여 영향을 받는다. CNP22는 NPR-B (7-30 pM 결합력) 뿐만 아니라, NPR-C (11-140 pM)에도 단단히 결합한다 (Bennett, B.D. et al., J. Biol. Chem., 266: 23060-67 (1991); Koller K.J. & Goeddel, D.V., Circulation, 86: 1081-88 (1992); Suga, S. et al., Endocrinology, 130: 229-39 (1992)). 상기 NPR-B 결정 구조가 아직 보고되지 않았다고 하더라도 (He, X.-L. et al., Science, 293(5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. et al., J. Biol. Chem., 279(27): 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361(4): 698-714 (2006)), NPR-C와 NPR-A간의 유사성뿐 아니라 시퀀스 상동성은 NPR-B 가 유사한 전체적 구조적 접힘을 가질 것으로 추정된다는 것을 제시한다.

[0592] 그러므로, NPR-B 상동성 모델은 구조-기반 시퀀스 정렬 및 다음의 관련된 시스템의 결정 구조에 기반하여 만들어졌다 : NPR-C에 결합된 CNP, NPR-A에 결합된 ANP, 및 NPR-C에 결합된 ANP (He, X.-L. et al., Science, 293(5535): 1657-62 (2001); Ogawa, H. et al., J. Biol. Chem., 279(27): 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361(4): 698-714 (2006)). 상기 수용체가 결합 펩티드 형태를 결정하고, NPR-B가 1차 구조 및 기능적인 특성에 있어서 NPR-A와 가장 유사하다는 관찰에 기초하여, 상기 NPR-B/CNP 상동성 모델은 NPR-A/ANP 크리스탈 구조를 모델로 하여 만들어졌다. CNP 변이체 (U.S. Patent No. 5,434,133 및 US Patent Application Publication No. 2004/0138134 A1), 및 더 이상 NPR-C에 결합하지 않는 기능성 ANP 변이체 (Cunningham, EMBO 13(11) 2508-15, 1994)의 공표된 신호 데이터는 상기 NPR-B/CNP 모델로 정의되고 해석되어 사용되었다.

[0593] 본 발명은 상기 NPR-B/CNP 복합체의 상동성 기반 구조 모델에 기초하여 향상된 NPR-B 선택성을 가지도록 디자인된 CNP 변이체에 관한 것이다. 다양한 수용체에 결합된 나트륨이뇨 펩티드의 실험 및 컴퓨터 구조 데이터와 공개된 기능성 데이터와의 결합에 의하여, NPR-B에의 결합이 유지되지만, 상기 NPR-C 제거 수용체에 대하여 감소된 결합력을 가질 가능성이 있는 CNP 변이체가 생성되었다.

[0594] 예를 들어, NPR-C는 펩티드 결합 부위의 루프 구조에서 독특한 삽입을 가지는데, NPR-A 및 NPR-B에서의 개개의 루프 (loop) 잔기와 비교하여, 그것의 루프 잔기는 CNP Gly8 (또는 ANP Gly9)과 같은 상기 펩티드 잔기에 더 가깝게 존재한다. 선행 연구는 ANP에서의 상기 G9T 돌연변이가 NPR-C에 대한 결합력을 감소시키는데 기여하고, 이에 따라서 NPR-A 선택성을 향상시킴을 제시하였다 (Cunningham, EMBO J., 13(11): 2508-15 (1994)). 따라서, CNP 변이체는 그것의 NPR-B로의 결합에는 영향을 주지 않고 NPR-C로의 CNP 결합을 방해하기 위하여, 해당하는 Gly8 잔기를 더 큰 잔기 (Ser, Val, Thr 또는 Asn)로 대체하기 위하여 생성되었다. 더욱이, Gly15 내지 Gly21를 포함하는 CNP의 C-말단에 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 도입되었고, 이것은 수용체/펩티드 복합체의 상세한 구조 분석에 기초하여, 수용체-특이성 잔기와 반응하는 것이 예측된다. 예를 들어, CNP22에서 G19R 돌연변이는 NPR-B 신호 활성의 현저한 손실이라는 결과를 가져오지 않는다. 그러나, 상기 돌연변이는 이웃 잔기의 형태를 바꾸지 않으면서 NPR-C/CNP의 이용가능한 크리스탈 구조로 모델화할 수 없다. 상기 관찰은 G19R 돌연변이가 NPR-C와 같은 특별한 수용체로의 CNP의 결합을 선택적으로 방해할 수 있다는 것을 제시하는 것이다.

[0595] 일 구현예에서, 상기 CNP 변이체는 형태적 가용성을 감소시키고 이에 따라 수용체 특이성을 증가시키기 위하여, 1, 5, 8, 15, 19 및 21 포지션의 하나 또는 그 이상의 Gly 부위에서 치환(들)을 가진다. NPR-C 및 NPR-A에 결합된 ANP의 크리스탈 구조의 비교분석 (Ogawa, H. et al., J. Biol. Chem., 279: 28625-31 (2004); He, X.-L., J. Mol. Biol., 361: 698-714 (2006))은 ANP의 상기 형태적 가동성이 수용체 선택성을 결정하는데 있어서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 제시한다.

[0596] 일 구현예에서, NPR-C에 대하여 잠재적으로 감소된 친화도를 가지는 기능성 CNP 변이체는 하나 또는 그 이상의 다음 아미노산 치환을 가진다: 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 및 G21R. 일 구현예에서, CNP 변이체는 1, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 20 및/또는 21의

포지션에서 다중(multipoint) 치환되고, 변이체 펩티드 시퀀스의 어떤 다른 지점에서 선택적인 변형을 가질 수 있다.

[0597] 추가적인 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 CNP 변이체는, 여기에서 일반적으로 설명된 범위로 특정된 전체 질량만큼, (예를 들어, N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위에서 약 2.6 또는 2.8kDa 내지 약 6 또는 7kDa)의 모이어티로 뼈/연골 표적화를 가능하게 하도록, NPR-C 및 신정화를 감소시키도록, NEP 분해에 대한 저항성 및/또는 CNP 기능성 향상시키도록 N-말단, C-말단 및/또는 내부 부위에서 컨쥬게이트 될 수 있다. 일 구현예에서, CNP 변이체는 고리 영역(CNP22의 Cys6에서 Cys22까지에 상응하는)이내의 부위에서 폴리머 모이어티에 대해 컨쥬게이트 되지 않는다. CNP 변이체에 대하여 컨쥬게이트될 수 있는 폴리머 또는 비-폴리머 모이어티의 제한되지 않는 예는 예로 비스포스페이트 (bisphosphonates)와 같은 합성의 뼈-표적화 화합물; 예로 폴리Asp 및 폴리Glu와 같은 뼈/연골 표적화 펩티드 시퀀스; 예로 오스테오폰틴 (osteopontin), 오스테오칼신 (osteocalcin) 및 시알로프로틴 (sialoprotein)과 같은, 뼈 단백질의 뼈-타겟팅 영역으로부터 유도된 펩티드 시퀀스; 예로 BMP2, BMP3, BMP5, BMP7 및 BMP8a 와 같은 뼈 형성 단백질 (bone morphogenetic proteins)의 기능성 도메인으로부터 유도된 펩티드 시퀀스; 예로 NPPC, ANP 및 BNP와 같은 나트륨이뇨의 근원인 폴리펩티드로부터 유래된 펩티드 시퀀스; 예로, 탄수화물, 지방산 및 인지질과 같은 기타 천연 폴리머 또는 비-폴리머 부분; 예로, PEG(또는 PEO)와 같은 생체적합성 합성 친수성 폴리머; 예로 헵타노익산 및 펜타노익산과 같은 소수성 폴리머 또는 비-폴리머 부분; 및 그것들의 조합을 포함한다.

[0598] 본 명세서에서 기재된 CNP 변이체는 예컨대, cGMP 생산 및 신호의 자극과 관련하여 CNP22와 실질적으로 유사하거나 또는 그보다 나은 기능적 활성을 가질 수 있다. 일 구현예에서, CNP 변이체는 생체외 실험 또는 생체내 실험에서, 동일한 wtCNP22 농도 (예, 1uM) 하에서 생산된 cGMP 수준의 적어도 약 50%의 cGMP 수준의 생산을 자극한다. 어떤 구현예에서, CNP 변이체는 생체외 실험 또는 생체내 실험에서, 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%의 야생형 CNP22의 cGMP-자극 활성을 유지한다. 다른 구현 예에서, CNP변이체는 CNP22에 비하여 개선된 cGMP-자극 활성을 가진다. 특정한 구현 예에서 CNP변이체는 생체외 실험 또는 생체내 실험에서 동일한 wtCNP22(예, 1uM) 농도 하에서 생산된 cGMP의 적어도 약 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500% 또는 그 이상의 cGMP 정도의 생산을 자극한다.

[0599] 본 명세서의 개시로부터 선택적으로 제외된 것은, 여기에 참조로 포함된 어떤 선행문헌에서 특히 개시된 나트륨이뇨 펩티드 (예로 CNP), 단편 및 변이체의 어떤 것, 및 실질적으로 생산된 나트륨이뇨 펩티드 (예로 CNP), 단편 및 변이체의 어떤 것으로 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, 및 Furuya et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 183: 964-969 (1992)).을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 이러한 모든 문헌은 여기에 전체로서 참조로 포함된다.

[0600] 일 구현예에서, 본 발명은, 알려져 있는 모든 인간 기원의 및 비-인간 기원의 야생형 CNP-53, 야생형 CNP-22, 야생형 CNP-17, 야생형 BNP, 및 야생형 ANP를 선택적으로 제외한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 본 개시는 인간 CNP-17, 인간 CNP-22, 닭 CNP-22 (hCNP-22에 상응하는(Leu9Val)), 송어 및 장어류 CNP-22 (hCNP-22에 상응하는 (Leu2Trp, Ser3Asn, Lys4Arg)), 개구리 CNP22-I (hCNP-22에 상응하는(Leu2Tyr, Lys4Arg, Leu9Val, Ser16Ala, Met17Phe)), 개구리 CNP22-II (hCNP-22에 상응하는(Leu2Thr, Ser16Ala)), 인간 CNP-53, 및 돼지 및 생쥐 CNP-53 (hCNP-53에 상응하는(Gln17His, Ala28Gly))를 선택적으로 제외한다. 다른 구현예에서, 본 개시는 인간 및 비-인간 동물의 생체내의 단백질 가수분해 절단에 의해 생산된 NPPC, proCNP 및 CNP-53의 조각을 선택적으로 제외한다. 또 다른 구현예에서는 본 개시로부터 선택적으로 제외된 것이 다음의 야생형 인간 CNP-53: CNP-50, CNP-46, CNP-44, CNP-39, CNP-30, CNP-29, CNP-28, CNP-27 및 CNP-26의 잘려진 단편이다.

[0601] 추가적인 구현예에서, 본 발명은 또는 트리아키스 실리아 (*Triakis scyllia*) 및 실리오리너스 카디큘라 (*Scyliorhinus canicula*) (참조,M.Takanoetal.,Zool.Sci.,11:451-454(1994)) 라는 상어 종으로부터 분리되거나 얻어진 CNP 펩티드 또는 그의 단편으로,

[0602] RLLKDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-41) (서열번호 204);

[0603] LKDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-39) (서열번호 205);

[0604] KDLSNNPLRFRGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-38) (서열번호 206); 및

[0605] GPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (서열번호 207)를 포함하는 것을 선택적으로 제외한다.

[0606] 또 다른 구현예에서, 본 명세서로부터 선택적으로 제외된 것은 람나디트로피스 (*Lamnaditropis*)(참조

M.Takanoetal.,Zool.Sci.,11:451-454(1994))라는 상어 종으로부터 분리되거나 얻어진 CNP 펩티드 또는 그의 단편으로,

[0607] RLLKDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-41) (서열번호 208);

[0608] LKDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-39) (서열번호 209);

[0609] KDLSNNPLRFKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-38) (서열번호 210);

[0610] FKGRSKKGPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-29) (서열번호 211); 및GPSRGCFGVKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (서열번호 212)을 포함한다.

[0611] 또 다른 구현예로서, 본 개시로부터 선택적으로 제외된 것은 스쿠알루스 아칸티아스 (*Squalus acanthias*)(참조 M.Takanoetal.,Zool.Sci.,11:451-454(1994))라는 상어 종으로부터 분리되거나 얻어진 CNP 펩티드 또는 그의 단편으로,

[0612] RLLQDLSNNPLRFKGRSKKGPSRSCFGLKLDRIGAMSGLGC (CNP-41) (서열번호 213); 및

[0613] GPSRSCFGLKLDRIGAMSGLGC (CNP-22) (서열번호 214)을 포함한다.

[0614] 추가적 구현예에서, 본 발명은 메다카(medaka) 및 복어로부터 분리되고, K. Inoue etal.,Proc.Nat.Acad.Sci.,100(17):10079-10084(2003)에서 "CNP-1", "CNP-2", "CNP-3" 및 "CNP-4"로 지칭된, 하기를 포함하는 CNP 펩티드를 선택적으로 제외한다 :

[0615] GWNRGCFGLKLDRIGSMSGLGC (메다카(medaka) 및 복어 CNP-1) (서열번호 215);

[0616] PMVAGGGCFGMKMDRIGSISGLGC (메다카 CNP-2) (서열번호 216);

[0617] GRSSMVGGRGCFGMKIDRIGSISGLGC (복어 CNP-2) (서열번호 217);

[0618] GGMRSCFGVRLERIGSFSGLGC (메다카 CNP-3) (서열번호 218);

[0619] GGLRSCFGVRLARIGSFSGLGC (복어 CNP-3) (서열번호 219);

[0620] GGSTSRSGCFGHKMDRIGTISGMGC (메다카 CNP-4) (서열번호 220); 및

[0621] ggssrsgcfghkmdrigtisgmgc (복어 CNP-4) (서열번호 221).

[0622] 추가적 구현 예에서, 본 발명은 오리너구리의 독으로부터 분리된 CNP-39 및 그것들의 CNP-22 단편, G. de Plater etal.,Toxicon.,36(6):847-857(1998)에서 "ovCNP-39" 및 "ovCNP-39(18-39)"으로 지칭된, 하기를 포함하는 CNP 펩티드를 선택적으로 제외한다 :

[0623] "LLHDHPNPRKYKPANKKGLSKGCFGLKLDRIGSTSGLGC (ovCNP-39) (서열번호 222); 및

[0624] GLSKGCFGLKLDRIGSTSGLGC (ovCNP-39(18-39)) (서열번호 223)이다.

[0625] 다른 추가적 구현예에서 본 발명은 US 2007/0197434에서 특별히 개시된 다음의 펩티드:

[0626] Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (서열번호 224);

[0627] Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (서열번호 225);

[0628] Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Ala-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (서열번호 226);

[0629] Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys (서열번호 227);

[0630] 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 (서열번호 228); 및

[0631] Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr (서열번호 229)를 선택적으로 제외한다.

[0632] 다른 구현예에서 본 발명은 US 2007/0197434에서 일반적으로 개시된 서열번호 10의 펩티드를 선택적으로 제외하며, 여기에서 이런 펩티드는 4, 5, 6, 11, 12, 14 및/또는 15의 지점에서 특정한 천연 아미노산 치환을 가지는 CNP-17 변이체이다. 또 다른 구현예에서는 본 발명으로부터 선택적으로 제외된 것은 hCNP-53(Ser47Ala), hCNP-53(Met48Gln), hCNP-53(Met48Ala), 및 hCNP-53(C-term.)-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr에 상응하는 펩티드이다.

[0633] 일 구현예에서, 본 발명은 US 7,276,481에 구체적으로 개시된 서열번호 1-4 및 6-71의 펩티드를 선택적으로 제외한다. 또 다른 구현예에서 본 발명은 US 7,276,481에 일반적으로 개시된 서열번호 5의 펩티드를 선택적으로 제외하고, 여기에서 이런 펩티드는 Leu9, Lys10, Leu11, Ser16, Met17, Gly19, 및/또는 Leu20에서 적어도 하나의 천연 아미노산 치환을 가지는 CNP17의 변이체이다. 또 다른 구현 예에서 선택적으로 제외된 것은 CNP17 또는 N-Me-Phe7, 또는 N-Me-Phe7 및 N-Me-Leu11를 포함하는 그것들의 변이체이다. 추가적인 구현 예에서 본 개시는 US 7,276,481에 개시된 것과 같은 성장 호르몬(GH), 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1), 또는 갑상선 호르몬(TH)에 융합 또는 컨쥬게이트되는 서열번호 5의 CNP17 변이체를 선택적으로 제외한다. 또 다른 구현 예에서 선택적으로 제외된 것은 CNP22가 GH, IGF-1 또는 TH에 융합되거나 또는 GH, IGF-1 또는 TH에 링커를 통해 부착된 CNP22 변이체이다. 또 다른 구현 예에서 선택적으로 제외된 것은 CNP17 또는 그것의 변이체가 N-말단, C-말단에서 비오틴 또는 플루오레세인에 컨쥬게이트된 CNP17변이체이다.

[0634] 추가적인 구현예에서 본 발명은 US 5,434,133에 특별히 개시된 서열번호 1-17, 22-24, 30, 31 및 40-42 및 화합물 1-27의 펩티드를 선택적으로 제외한다. 또 다른 추가적 구현예에서 본 발명은 US 5,434,133에 일반적으로 개시된 서열번호 18-21 및 25-29의 펩티드를 선택적으로 제외한다. 또 다른 구현예에서 본 발명은 WO 94/20534에 특별히 개시된 서열번호 1-4 및 9의 펩티드를 선택적으로 제외한다.

[0635] 그러나 몇몇 구현 예에서, 본 발명은 여기에서 선택적으로 제외된 나트륨이뇨 (예 CNP)펩티드, 단편의 사용방법뿐만 아니라 나트륨이뇨 펩티드(예, CNP), 단편 및 변이체와 같은 것을 포함하는 약제학적 조성물(무균의약품 조성물을 포함하는)의 사용 방법을 여전히 포함한다.

[0636] **C. CNP 변이체의 합성 및 정제**

[0637] 몇몇 구현 예에서, 여기서 설명된 CNP 변이체는 특정한 구현 예에서 당업계에 알려진 특정한 기술을 사용한 재조합체의 발현에 의해 제조된다. 예컨대 Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)): 및 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994) 참조.

[0638] 어떤 구현예에서 여기에 설명된 CNP 변이체는 배지에서 배양, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 융합 폴리펩티드의 발현을 초래하는 조건 하에서, 절단 가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 제 2폴리뉴클레오티드에 연결된 CNP 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포를 배양하는 과정을 포함하고, 여기에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 절단가능한 펩티드에 직접 연결된 CNP 변이체 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 이와 링커를 통해 간접적으로 연결된 것을 포함하는 재조합 과정에 의해 제조된다. 어떤 구현예에서는 숙주세포는 절단 가능한 펩티드 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 연결된 CNP 변이체 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된다. 어떤 구현예에서 융합 폴리펩티드는 용해성 단백질 또는 봉입체로 발현된다. 발현된 융합 폴리펩티드는 숙주 세포 또는 배지로부터 분리될 수 있고 분리된 융합 폴리펩티드 절단제에 접촉하여 CNP 변이체를 방출할 수 있다.

[0639] CNP 변이체를 제조하는데 사용되는 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충, 비-포유류의 척추동물 또는 포유류의 세포일 수 있다. 박테리아 세포는 E.coli 세포 라인 및 균주를 제한없이 포함한다. E.coli 세포 라인 및 종의 제한되지 않는 예는, BL21, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3)pGro7, Arctic Express(DE3), C41[alsocalledC41(DE3)], C43[alsocalledC43(DE3)], OrigamiB(DE3), OrigamiB(DE3) pLysS, KRX, 및 Tuner(DE3)를 포함한다. 일 구현예에서 CNP 변이체와 CNP 융합 단백질은 BL21(DE3) 세포를 사용하여 제조된다. 포유류 세포, 햄스터, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 소, 돼지, 쥐(mouse), 쥐(rat), 토끼, 양 및 인간 세포를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는다. 숙주 세포는 불멸화 세포 (세포 라인) 또는 비-불멸화(일차적인 또는 이차적인) 세포가 될 수 있으며 섬유아세포, 각질세포, 상피세포(예컨대, 포유류의 상피 세포, 장상피 세포), 난소 세포(예컨대, 중국 햄스터 난소 또는 CHO세포), 내피세포, 신경교세포, 신경세포, 혈액 형성 요소(예컨대, 림프구, 골수 세포), 연골세포 및 다른 뼈-유래 세포 및 이러한 신체 세포 종류의 선구물질과 같은 폭넓고 다양한 어떤 세포 종류 일 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다. CNP 변이체 DNA 또는 RNA를 포함하는 숙주 세포는 세포의 성장, DNA 또는 RNA의 발현 및 CNP변이체 세포 발현의 증명/선택에 적절한 조건하에서 배양된다. 어떤 구현예에서 숙주 세포는 약 10℃에서 약 40℃ 또는 약 20℃에서 약 40℃ 또는 약 30℃에서 약 40℃의 온도에

서 시한동안 성장 또는 배양된다. 특정한 구현 예에서 숙주 세포는 약 20℃, 22℃, 25℃, 28℃, 30℃, 35℃ 또는 37℃에서 기한동안 성장 또는 배양된다. 특정한 구현 예에서 숙주 세포는 약 35℃ 또는 약 37℃의 시한 동안 성장 또는 배양된다.

[0640] CNP 변이체 폴레펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드(CNP 융합 단백질)는, 발현되는 뉴클레오타이드 시퀀스에 연결된 발현 조절 시퀀스를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터에서 발현된다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 cis-acting 요소; 숙주 세포 또는 생체외 발현 시스템에 의해 공급될 수 있는 발현을 위한 기타 요소를 포함한다. 발현 벡터는 제한없이 코스미드, 플라스미드(예로, 리포솜이 벗겨진 또는 포함되는) 및 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 이외에 공지된 모든 것을 포함한다. 발현 벡터는 폴리펩티드 암호화 폴리뉴클레오티드의 발현을 위해 형질전환 또는 트랜스팩션으로 적절한 숙주세포에 함입된다(예, Sambrook et al.(supra)).

[0641] 절단 가능한 CNP 융합 단백질을 포함하는 CNP 변이체의 생산을 위해 고려된 발현 벡터의 제한되지 않는 예는, pJexpress, pJexpress401, pJexpress404, pET-15b, pET-21a, pET-22b, pET-31b, pET-32a, pET-41a, pMAL, pMAL-c2X, pQE-30, pET-SUMO, 및 pTYB11를 포함한다. 특정 구조의 발현은 용해성 CNP 변이체(CNP 융합 단백질을 포함하는) 또는 봉입체의 형태인 용해성 CNP 변이체(CNP 융합 단백질을 포함하는)을 생성할 수 있다.

[0642] 몇몇 구현예에서 CNP 변이체 도는 CNP 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현은 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드 (IPTG)-유도 벡터를 사용하여 향상된다. 몇몇의 구현예에서 숙주 세포는 약 10℃내지 약 40℃ 또는 약 20℃ 내지 약 40℃ 또는 약 30℃ 내지 약 40℃의 온도에서 IPTG 존재하에 일정 시간 동안 성장 또는 배양된다. 특정한 구현 예에서 숙주 세포는 약 20℃, 22℃, 25℃, 28℃, 30℃, 35℃ 또는 37℃에서 IPTG 존재하에, 일정 기한동안 성장 또는 배양된다. 어떤 구현 예에서 숙주 세포는 1mM의 IPTG 하에서 약 35℃ 또는 약 37℃에서 일정 시간 동안 성장 또는 배양된다.

[0643] 추가적인 구현 예에서, 상기 숙주세포는 약 0.4mM 내지 약 2mM 또는 약 0.4mM 내지 약 1.5mM 또는 약 0.4mM 내지 약 1mM의 농도의 IPTG와 함께 배양된다. 어떤 구현예에서 IPTG는 약 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 or 2 mM이다. 일 구현 예에서 IPTG 의 농도는 약 1mM이다.

[0644] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 개시된 CNP 변이체는 CNP 변이체 폴리펩티드 및 절단 가능한 운반체 단백질 또는 절단 가능한 태그(예로, 펩티드 태그)를 포함하는 융합 단백질로써 재조합적으로 발현되며, 여기에 있어서 융합 단백질은 절단 가능한 운반체 단백질에 직접 연결된, 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 CNP 변이체 폴리펩티드를 포함한다. 운반체 단백질 또는 태그를 사용하면 융합 단백질의 검출, 분리 및/또는 정제가 용이해진다. 절단 가능한 단백질 및 태그는, 히스티딘(예로, hexa-His)태그; 인간 전사 인자 TAF12(TAF12), TAF12 단편, TAF12 히스톤 폴드 도메인, TAF12의 돌연변이 및 그것들의 조각, 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); 케토스테로이드 아이소머라제(KSI); 말토스-바인딩 단백질(MBP); ß-galactosidase (ß-Gal); glutathione-S-transferase (GST); thioredoxin (Trx); 키틴 바인딩 도메인(CBD); BMP-2, BMP-2 돌연변이, BMP-2(C/A); SUMO; 및 그것들의 돌연변이체 및 단편을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0645] 발현 구조체는 CNP 변이체 및 운반체 단백질 또는 태그를 포함하는 융합단백질을 발현할 수 있다. 상기 태그는 융합단백질에 유용한 성질을 주는 아미노산 시퀀스일 수 있다. 일 구현예에서 태그는, 융합 단백질을 리간드를 포함하는 분리 배지에 적용함으로써 융합 단백질을 정제하는데 쓰일 수 있는 리간드-바인딩 도메인이다. 예를 들어, 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (GST) 도메인을 포함하는 융합 단백질은 글루타치온-연결 분리 배지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼에 적용될 수 있다. 다른 예를 들면, 태그로써 말토오즈-바인딩 단백질(MBP)를 포함하는 융합 단백질은 말토오즈를 포함하는 분리 배지에 적용될 수 있다. 추가적인 예로, 폴리히스티딘 태그를 포함하는 융합 단백질은 니켈 컬럼에 적용될 수 있고, 그것에 의하여 니켈 컬럼에 대한 폴리히스티딘의 킬레이션이 융합 단백질의 정제를 용이하게 한다. 다른 구현예에서 태그는 리간드이다. 예를 들어, 융합 단백질은 글루타치온을 태그로 포함할 수 있고, 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (GST)-연결 분리 배지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼에 적용될 수 있다. 운반체 단백질 및 융합 단백질에 사용되는 태그의 제한되지 않는 예는 인간 전사 인자 TAF12 (TAF12), 케토스테로이드 아이소머라제(KSI), 말토오즈-바인딩 단백질(MBP), ß-갈락토시다제 (ß-Gal), 글루타치온-S-트랜스퍼라제(GST), 티오레독신 (Trx), 키틴-바인딩 도메인(CBD), BMP-2 돌연변이(BMPM), SUMO, CAT, TrpE, 스타피로코컬 단백질 A (staphylococcal protein A), 스타피로코컬 단백질류, 녹말-바인딩 단백질, 엔도글루카나제 A의 셀룰로오스-바인딩 도메인, 엑소글로카나제 Cex의 셀룰로오스-바인딩 도메인, 비오틴-바인딩 도메인, recA, Flag, 폴리(His), 폴리(Arg), 폴리(Asp), 폴리(Gln), 폴리(Phe), 폴리(Cys), 초록 형광 단백

질, 붉은 형광 단백질, 노란 형광 단백질, 청록 형광 단백질, 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 항체 에피토프 및 돌연변이 및 그것들의 단편을 포함한다.

[0646] 목적하는 CNP 변이체를 생성하기 위하여, 운반체 단백질 또는 태그는 화학적 절단, 프로테아제 절단 또는 단백질 자가 절단의 수단으로 융합 단백질로부터 절단될 수 있다. 바람직한 화학적 및 단백질 가수분해적 절단제 (덧붙여말하면, 절단 위치)는 포름산(Asp-Pro), 시아노겔 브롬화물(CNBr)(Met-X), 하이드록실아민(Asn-Gly), Xa (IEGR-X) (서열번호 230)요인, 엔테로키나아제(DDDDK-X) (서열번호 231), ProTEV (EXXYXQ-G) (서열번호 232) 및 SUMO 프로테아제를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다. 화학적 절단에 있어서 특정한 종류의 성질로 인하여, 포름산을 사용한 절단은 Pro-CNP를 생성할 수 있고, CnBr을 사용한 절단은 Met-to-Asn 치환을 가지는 CNP를 생성할 수 있고, 히드록실아민을 사용하는 절단은 Gly-CNP를 생성할 수 있다. 대안으로, 화학적 또는 프로테아제 절단은 CNP 변이체가 융합 단백질로써 발현하지 않게 하는 특정한 구조체(예로, pET-21a-CNP)를 사용함으로써 피할 수 있다. pET-21a-CNP의 발현은 Met-CNP를 생성할 수 있다. 또는 특정 융합 단백질(예로, intein-CBD를 포함하는 것들)은 CNP를 생성하기 위한 자기-절단을 진행할 수 있다.

[0647] 추가적 구현예에서 융합 단백질은, CNP 변이체와 운반체 단백질 또는 태그 (예컨대, 펩티드 태그) 사이에서 절단 가능한 펩타드 링커를 포함한다. 특정한 구현 예에서, 쪼개질 수 있는 펩티드 링커는 Asp-Pro, Asn-Gly, Met-X, Val-Asp-Asp-Arg (서열번호 233), Gly-Ser-Asp-Arg (서열번호 234), Ile-Thr-Asp-Arg (서열번호 235), Pro-Gly-Asp-Arg (서열번호 236), Ile-Glu-Gly-Arg-X (서열번호 230), Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-X (서열번호 231), Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly (서열번호 232), Ala-Phe-Leu-Gly-Pro-Gly-Asp-Arg (서열번호 237), 및 MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHTGDDDDKHMD (pET-15b 링커) (서열번호 95)(여기의 X 는 아미노산을 나타냄)으로 이루어진 그룹에서 선택된다. 몇몇 구현예에서 절단 가능한 펩티드 링커는 팔라듐, 시아노겐 브로마이드(CNBr),포름산, 히드록실아민, 클로스트리파인, 트롬빈, 키모트립신, 트립신, 트립신 유사 프로테아제, 카르복시펩티다아제, 엔테로키나아제(enteropeptidase), Kex 2 프로테아제, Omp T 프로테아제, Factor Xa 프로테아제, 서브틸리신, proTEV, SUMO 프로테아제, V8 프로테아제, HIV 프로테아제, 리노바이러스 프로테아제, 퓨리리신 프로테아제, IgA 프로테아제, 인간 Pace 프로테아제, 콜라게나제, Nia 프로테아제, 폴리오바이러스 2Apro 프로테아제, 폴리오바이러스 3C 프로테아제, 제네나제 (genenase), 퓨린, 엘라스타제, 프로티네이즈 K (Proteinase K), 펩신, 레닌 (키모신), 세균 아스파틱 프로테아제 (microbial aspartic proteases), 파파인, 칼파인, 키모파파인, 피신 (ficin (피카인, ficain)), 브로멜라닌 (브로멜라아제), 캐스피신 B (cathespisin B), 파스파제, 써모리신, 엔도프로테아제 Arg-C, 엔도프로테아제 Glu-C, 엔도프로테아제 Lys-C, 칼리크레인, 및 플라스민으로 이루어진 그룹에서 선택된 절단 시료에 의해 절단된다.

[0648] 어떤 구현 예에서 절단 가능한 운반 단백질, 태그 (예컨대, 펩티드 태그) 또는 펩티드 링커는 포름산을 사용하여 절단되어, 융합 단백질로부터 CNP 변이체를 방출한다. 몇몇 구현예에서 포름산은 약 1% 내지 약 20% 또는 약 1% 내지 약 15% 또는 약 2% 내지 약 15% 또는 약 1%에서 약 10% 내지 약 2%에서 약 5% 농도이다. 특정한 구현예에서 포름산은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% 농도이다. 특정한 구현예에서 포름산은 약 2%, 5% 또는 10%의 농도이다.

[0649] 추가적 구현예에서 포름산 존재 하에서의 CNP 융합 단백질의 절단은, 약 20℃ 내지 약 80℃ 또는 약 30℃ 내지 약 75℃ 또는 약 40℃ 내지 약 75℃ 또는 약 50℃ 내지 약 75℃ 또는 약 50℃ 내지 70℃ 또는 약 55℃ 내지 약 70℃ 또는 약 50℃ 내지 약 60℃의 온도에서 수행된다. 몇몇 구현예에서, 절단은 포름산 존재 하에서, 약 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 또는 80 ° C에서 수행된다. 특정한 구현 예에서의 절단은 포름산 존재 하에서 약 50 ° C, 55 ° C, 60 ° C, 65 ° C 또는 70 ° C에서 수행된다. 특정한 구현 예에서 절단은 포름산 존재 하에서 약 55 ° C 또는 70 ° C에서 수행된다.

[0650] 추가적인 구현 예에서, 포름산 존재 하 CNP 융합 단백질의 절단은 약 3hr 내지 약 48hr 또는 약 5hr 내지 약 48hr 또는 약 5hr 내지 약 36hr 또는 약 5hr 내지 약 24hr 또는 약 5hr 내지 약 18hr 또는 약 20hr 내지 약 24hr 또는 약 6hr 내지 약 10hr의 시한에서 수행된다. 특정한 구현 예에서 절단은 포름산 존재 하의 약 5 hr, 6 hr, 12 hr, 15 hr, 18 hr, 20 hr 또는 24 hr 수행된다.

[0651] 몇몇 구현예에서 CNP 융합 단백질의 절단은 약 2%, 5% 또는 10%의 포름산의 존재 하 약 55℃ 온도에서 약 20hr 내지 약 36hr, 또는 약 60℃의 온도에서 약 15hr 내지 약 24hr, 또는 약 65℃의 온도에서 약 10hr 내지 약 21hr, 또는 약70℃의 온도에서 약 6hr 내지 약 18hr동안 수행된다. 특정한 구현 예에서 CNP 융합 단백질의 절단은 약 2%의 포름산의 존재 하에 약 55℃의 온도에서 약 20hr 내지 약 24 또는 36hr, 또는 약 60℃의 온도에서

약 15hr 내지 약 24hr, 또는 약 65℃에서 약 10hr 내지 약 18hr 또는 약 70℃에서 약 6hr 내지 약 10hr 동안 수행된다.

[0652] 본 발명은 높은 수율의 CNP 변이체를 제공하기위해 포름산을 사용하여 CNP 융합 단백질의 절단을 위한 온화한 조건을 제공한다. 여기에 설명된 포름산을 사용하는 융합 단백질 절단 조건은 또한, CNP외 다른 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하며, 상기 Asp-Pro 펩티드 결합을 포함하는 융합 단백질의 절단에 적합하다.

[0653] 추가적인 구현예에서 용해성 CNP 융합 단백질 또는 CNP 융합 단백질 봉입체는 화학적 절단(예컨대, 포름산 사용) 또는 CNP 융합 단백질의 단백질 가수분해 절단 전에, 완충용액 및/또는 세제와 함께 처리된다. 완충용액의 제한되지 않는 예로 B-PER II; diluted B-PER II (e.g., 1/20 dilution); B-PER; B-PER phosphate buffer; Tris (e.g., 25 mM Tris, pH 7.5)를 포함하는 버퍼 ; Tris 및 NaCl (e.g., 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.9)를 포함하는 버퍼; 및 PBS를 포함한다. 추가적 구현예에서 완충용액은 B-PER II이다. 세제의 제한되지 않는 예로 옥틸수크로즈 (octylsucrose), 트리톤 X-100, 트윈-20, NP-40, and CA-630를 포함한다. 세제는 완충용액에 들어갈 수 있다(예컨대 25mM Tris 완충용액 중의 1% 세제, pH 7.5). 특정한 구현 예에서 세제는 Triton X-100 또는 CA-630이다.상기 방법 및 조건들은 본 명세서에 개시된 CNP 변이체를 생산하기 위해 상기 기재된 다른 방법 및 조건들과 조합하여 사용될 수 있다.

[0654] 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 상기 CNP 변이체는 펩티드 신시사이저 (peptide synthesizer)를 이용하여 합성되고 당업계에 알려진 방법 (예를 들어, Atherton과 Sheppard의 방법, *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach,* IRL Press (Oxford, England (1989)) 에 의하여 정제된다.

[0655] 펩티드는 예를 들면, 다음의 CNP 펩티드 시퀀스에 기초하여 합성될 수 있다 : G^{1}LS(KorR)GC^{6}F^{7}G^{8}L(KorRorNleor6-OH-Nle)LDRIGSMSGLGC^{22}.

[0656] 예시적인 CNP 변이체는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0657] **유사체 A** (GLSKGC(CH2NH)FGLKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 56) 는 상기 백본 (backbone) C^{6}의 "-C=O"기가 "-CH_2"기로 변환되어 만들어졌고;

[0658] **유사체 B** (GLSKGC(N-Me-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 57)는 상기 백본 (backbone) F^{7}의"-NH"기가 "-N-CH_3"기로 변환되어 만들어졌고;

[0659] **유사체 E** (GLSKGC(D-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 136)는 F^{7}에서 D-Phe를 이용하여 만들어졌고;

[0660] **유사체 F** (GLSKGCF(tBu-Gly)LKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 58)는 G^{8}에서 3차-부틸-Gly (tertiary-butyl-Gly)을 이용하여 만들어졌고;

[0661] **유사체 G** (GLSKGC(3-Cl-Phe)GLKLDRIGSMSGLGC) (서열번호 137)는 클로라이드 원자를 F7의 페닐 고리의 메타 포지션에 첨가하여 만들어졌고 (유사한 변이체가 Phe7의 페닐 그룹의 오쏘, 메타 및/또는 파라를 Cl, F, Br, OH 및/또는 CH3로 치환함에 따라 생성될 수 있다); 및

[0662] **유사체 H** (GLSKGC[NHCH$_2$CH(Ph)CO]GLKLDRIGSMSGLGC)(서열번호 59)는 F^{7}에서 (±)-3-(아미노)-2-페닐 프로피오닉산을 이용하여 만들어졌다.

[0663] 예를 들어, 아미노산 연장, 천연 또는 비천연 아미노산 또는 펩티드 결합 동배체로의 치환 및/또는 폴리머 또는 소수성 모이어티로의 컨쥬게이션을 가지는 CNP 변이체의 예시는 다음을 제한 없이 포함한다 :

[0664] 유사체 J C6-CH2-NH, N-Me-L9, N-Me-L20 (서열번호 91)

[0665] 유사체 K N-Me-L9, N-Me-L20 (서열번호 92)

[0666] 유사체 L N-Me-L9, N-Me-L11, N-Me-L20 (서열번호 93)

[0667] 유사체 M N-Me-L9, N-Me-L11 (서열번호 94)

[0668] 유사체 Z K4R, F7Y (서열번호 95)

[0669] 유사체 AA K4R, G8V (서열번호 96)

[0670] 유사체 AB K4R, G8S (서열번호 97)

[0671] 유사체 AC K4R, G8T (서열번호 98)

[0672] 유사체 AD K4R, L9T (서열번호 99)

[0673] 유사체 AE K4R, G15R (서열번호 100)

[0674] 유사체 AF K4R, G15Cit (서열번호 101)

[0675] 유사체 AG K4R, M17V (서열번호 102)

[0676] 유사체 AH K4R (서열번호 35)

[0677] 유사체 AJ K4R, L20V (서열번호 103)

[0678] 유사체 AK K4R, L20t-Bu-Ala (서열번호 104)

[0679] 유사체 AT G1E, K4E (서열번호 105)

[0680] 유사체 AV G1E, K4E - 펜타노익 산 (pentanoic acid) (N-말단에 붙어있는) (서열번호 106)

[0681] 유사체 AW G1E, K4E - 헵타노익 산 (heptanoic acid) (N-말단에 붙어있는) (서열번호 107)

[0682] 유사체 AX CNP17 (delta N-term) (서열번호 2)

[0683] 유사체 AY GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36)

[0684] 유사체 AZ R-CNP22(K4R) (서열번호 41)

[0685] 유사체 BB G1E - 헵타노익 산 (heptanoic acid) (N-말단에 붙어있는) (서열번호 108)

[0686] 유사체 BC G1E - 펜타노익 산 (pentanoic acid) (N-말단에 붙어있는) (서열번호 109)

[0687] 유사체 BF K4R, K10Cit (서열번호 110)

[0688] 유사체 BG K4R, K10Q (서열번호 111)

[0689] 유사체 BH K4R, K10R (서열번호 112)

[0690] 유사체 BJ K4R, G15N (서열번호 113)

[0691] 유사체 BK K4R, G15S (서열번호 114)

[0692] 유사체 BL CNP-37 (서열번호 60)

[0693] CNP-53 (서열번호 4)

[0694] 유사체 CA AAWARLLQEHPNA-CNP22 (서열번호 61)

[0695] 유사체 CB AAWARLLQEHPNAR-CNP22 (서열번호 62)

[0696] 유사체 CC DLRVDTKSRAAWAR-CNP22 (서열번호 63)

[0697] 유사체 CD SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH (N- 및 C-말단의 BNP 꼬리) (서열번호 68)

[0698] 유사체 CE GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (HSA-CNP22) (서열번호 81)

[0699] 유사체 CF GQPREPQVYTLPPS-CNP22 (서열번호 79)

[0700] PEG(24K)-CNP22

[0701] PEG(20K)-CNP22

[0702] PEG(5K)-CNP22

[0703] PEG(2K)-CNP22

[0704] PEG(2K)-CNP17

[0705] PEG(1K)-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36)

[0706] PEG(1K)-CNP22

[0707] PEO4-(PEO12)3(branched)-CNP22

[0708] PEO12-CNP22

[0709] PEO12-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36)

[0710] PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36); 및

[0711] 서열번호: 1, 2, 3, 4, 또는 5에 이르는 추가적인 변형을 포함하는 1 내지 6 및 34 내지 144, 및 그의 변이체.

[0712] 일 구현예에서, CNP변이체들은 Cys6 및 Cys22사이에 이황화 결합을 형성하는 것을 통해 고리화된다. Cys6은 예를 들면 호모시스테인과 같은 시스테인 또는 페니실라민일 수 있다. 추가적인 구현예에서, CNP변이체들은 머리-꼬리 결합, 곁사슬-곁사슬 결합, 곁사슬-머리결합 또는 곁사슬-꼬리 결합을 하는 공유결합에 의해 환화될 수 있다. 한 구현예에서, 공유결합은 (본 명세서에서 말단아미노산이라고 언급한) 펩티드의 N-말단에 있거나 N-말단쪽의 아미노산과 C-말단에 있거나 C-말단쪽의 아미노산 사이에 형성될 수 있다. 다른 구현예에서, 공유결합은 두 말단 아미노산의 곁사슬사이에 형성된다. 또 다른 실시예에서, 공유결합은 한 말단아미노산의 곁사슬과 다른 말단아미노산의 말단기 사이 또는 두 말단 아미노산들의 말단기 사이에 형성된다.

[0713] 말단 아민-말단 카르복실기의 머리-꼬리 고리화 반응은 여러 수단, 예를 들면 p-니트로페닐에스테르, 2,4,5-트리클로로페닐 에스테르, 펜타플루오르페닐 에스테르의 사용, 아지드법, 혼합무수물법, HATU, HOBt, HONSu 또는 HOAt와 같은 촉매를 사용하는 카보다이미드(예를 들면, DIC, EDC 또는 DCC) 또는 수지상 고리화반응을 통해 행해 질 수 있다.

[0714] 이에 더하여, 고리구조는 CNP변이체의 아미노산 잔기 및/또는 말단아미노산 잔기의 곁사슬을 포함하는 연결그룹(bridging group)을 통해 형성될 수 있다. 연결그룹은 펩티드의 두 부분이 고리화 반응을 할 수 있게 하는 화학적 모이어티이다. 연결그룹의 비제한적 예시는 아미드(아미드(amide)s), 티오에테르(thioethers), 티오에스테르(thioesters), 디설파이드(disulfides), 요소(ureas), 카르바메이트(carbamates), 설폰아미드(sulfon아미드(amide)s) 및 유사체들을 포함한다. 이런 연결그룹을 가지는 유닛을 통합하는 분야에 많은 방법들이 알려져 있다. 예를 들면, 락탐다리(lactam bridge, 즉, 환형 아미드)는 N-말단 아미노기 또는 곁사슬의 아미노기와 C-말단 카르복실산 또는 곁사슬의 카르복실기 사이에 형성될 수 있다. 예를 들면, 라이신(lysine) 또는 오르니틴(ornithine)의 곁사슬 및 글루탐산 또는 아스파트산의 곁사슬이 있다. 티오에스테르는 C-말단 카르복실기 또는 곁사슬의 카르복실기와 시스테인 또는 시스테인 유사체의 곁사슬에 있는 티올기 사이에 형성될 수 있다.

[0715] 그렇지 않으면, 란싸이오닌(lanthionine, 티오-다이알라닌) 잔기가 알라닌 잔기와 결합하여 티오에테르결합에 의한 공유결합을 통해 가교결합이 형성될 수 있다. 다른 방법에서는, 디카르복실산(dicarboxylic acid, 예를 들면 수베릭 산(octanedioic acid))과 같은 가교제가 유리아미노, 하이드록실기, 티올기와 같은 아미노산 곁사슬들의 기능기들을 결합할 수 있다.

[0716] 효소-촉매 고리화반응 또한 사용될 수 있다. 예를 들면, 티로시딘(tyrocidine)합성효소의 티오에스터레이즈(thioesterase) 도메인이 티오에스테르의 전구체를 고리화 하는데 사용될 수 있고, 서브틸리신 돌연변이체가 펩티드 글리콜래이트 페닐알라닐아미드에스테르(펩티드(peptide) glycolate phenylalanylamide esters)를 고리화 하는데 사용될 수 있으며, 항체 리가아제 16G3는 p-니트로페닐에스테르를 고리화 하는데 사용될 수 있다는 것들이 알려져 있다. 펩티드 고리화 반응에 대해서는 본 명세서에 전문을 참조하여 포함시키고 있는 Davies, J. peptide Sci., 9: 471-501(2003)에 기재되어 있다.

[0717] 한 구현예에서, 최종 고리화된 산물은 적어도 약 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99%의 순도를 갖는다.

[0718] **D. 화학적으로 변형된 CNP변이체들**

[0719] CNP22 또는 그 변이체들의 화학전 변형은 조작된 CNP 펩티드의 안정성 및 반감기 증가, 면역원성의 감소와 같은 유익한 특성들을 줄 수 있다. (치료단백질의 화학적 변형에 관한 전반적 내용은 Pharmazie, 57(1):5-29(2002)참조) 예를 들면, 본 명세서에서 일반적으로 개시된 범위인 약 2.6 또는 2.8kDa에서 약 6 또는 7 kDa의 범위로 CNP 펩티드의 총 질량의 증가를 위한 CNP 펩티드에 천연 또는 합성의 폴리머릭 또는 비-폴리머릭 부분들(예를 들면 PEG)의 부착은 변형된 펩티드의 생체내에서의 엑소펩티다아제 및/또는 엔도펩티다아제(예:NEP)에 의한 절

단에 대한 민감성을 감소시킬 수 있다. 페길레이션(PEGylation)뿐 아니라, 클리코실레이션(glycosylation), 포스포릴화(phosphorylation), 아미드화(amidation), 카르복실화(carboxylation), 아세틸화(acetylation) 및 메틸화(methylation)에 의한 변형 및 산부가염, 아미드, 에스테르 및 N-아실 유도체들의 생성과 같은 다른 화학적 유도체화 과정들 또한 잠재적으로 면역성부위 및/또는 단백질 가수분해의 민감한 부분을 가릴 수 있다. (Science, 303: 480-482(2004))

[0720] 화학적 변형들의 예시는 베드나르사키 (Bednarsaki)의 폴리머 부가법 및 ㅇ알투스 사 (tus Corporation)의 가교법을 제한없이 포함하는데 이는 안정성 및 프로테아제저항성을 증가시키고, 면역원성을 감소시키기 위한 방법이다. 베드나르사키는 폴리머 부가가 단백질온도의 안정성을 증가시킬수 있음을 보이며, (J. Am. Chem. Soc., 114(1): 378-380(1992)), 알투스 사는 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 가교결합이 효소안정성을 증가시킴을 밝혔다.

[0721] 폴리펩티드의 화학적 변형은 비-특이적 방식(유도체합성된 종들의 혼합을 만드는방식) 또는 위치-특이성 방식(예를들면 야생형 고분자의 반응성에 따른 유도체화 및/또는 위치에 따른 돌연변이 유발 및 화학적 변형의 조합을 사용한 위치-선택적 변형에 기반을 둔 방식), 그렇지 않으면 표현단백질 결합법 (expressed protein ligation method)(Curr. Opin. Biotechnol., 13(4): 297-303 (2002))으로 수행될 수 있다.

[0722] **페길레이트된 CNP변이체**

[0723] 한 구현예에서, 안성성 증가(예를 들면, NEP 분해에 대한 저항성)를 위해, CNP22 또는 그 변이체들(아미노산 삽입, 치환 및/또는 결실한 것들을 포함)은 변형된 CNP 펩티드의 총질량을 약 2.6kDa 또는 2.8kDa에서 약 4,5,6,7kDa 이상의 범위로 증가시키기 위해 친수성, 천연 또는 합성 폴리머에 결합된다. 어떤 구현예에서, 부가된 친수성 폴리머는 약 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, 또는 약 5 kDa의 총 질량을 갖는다.

[0724] 한 구현예에서, 친수성 폴리머는 수용성이어서 그것에 결합된 CNP펩티드는 (예컨대, 생리적인) 수성환경에서 침전되지 않는다. 또한, 친수성 폴리머는 생체에 적합하다. 즉, 생체내에서 상처나 독성효과 또는 면역반응을 야기하지 않는다.

[0726] 친수성 폴리머는 가지가 있거나 없다. 한 구현예에서는 친수성 폴리머는 가지가 없다.

[0727] CNP22 또는 이의 변이체가 친수성 폴리머에 컨쥬게이션하는 다양한 부위가 가능하며, (1)N-말단에만; (2)C-말단에만; (3) 내부 부위(예를 들면 Lys4)에만; (4) N-말단과 C-말단의 양쪽; (5) N-말단과 내부의 부위; (6)C-말단과 내부의 부위를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다. 한 구현 예에서, CNP22 또는 이들의 변이체는 오직 N-말단에서만 친수성 폴리머에 컨쥬게이트한다. 다른 구현 예에서는, 컨쥬게이션은 오직 내부 부위(예를 들면 Lys4)에서만 있다. 또 다른 구현 예에서, 컨쥬게이션은 N-말단과 내부 부위(예를 들면 Lys4)에서 있다. 또 다른 구현 예에서, 더 나은 기능을 위해 CNP 펩티드는 (CNP22의 Cys6, Cys22에 상응하는) 고리부분 내의 부위(예를 들면 Lys10)에서 친수성 폴리머와 컨쥬게이션하지 않는다. 만약 친수성 폴리머와의 컨쥬게이션이 CNP펩티드의 반응성 1차 아미노기와의 결합을 형성하는것에 기반을 두고 있다면, 내부의 부위(예를 들면 Lys4 및/또는 Lys10)에서의 컨쥬게이션은 Lys4 및/또는 Lys10를 예컨대, Gly, Ser, Arg, Asn, Gln, Asp, Glu 또는 시트룰린(Cit)과 같은 곁사슬에 반응성 1차 아미노기를 포함하지 않는 천연 또는 비천연 아미노산이나, 펩티드모방체로 대체하는 것을 통해 방지될 수 있다. 어떤 구현 예에서는, Lys4 및/또는 Lys10은 Arg으로 대체된다. 다른 구현 예에서는 Lys10은 Arg으로 대체되지 않는다.

[0728] 친수성 폴리머의 비제한적인 예시는 카복시산-포함 모노머 (carboxylic acid-bearing monomers) (예컨대, 메타크릭 산 (MA) 및 아크릭 산(AA))로부터 형성된 폴리머, 폴리비닐 알콜, 히드록실-포함 모노머 (예컨대, 히드록시에틸 메타크리레이트 (HEMA), 히드록시프로필 메타크리레이트 (HPMA), 히드록시프로필 메타크릴아미드, 및 3-트리메틸실릴프로필 메타크리레이트 (TMSPMA))로부터 형성된 폴리머, 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리옥시에틸레이트 폴리올 (예컨대, 글리세롤), 폴리(에틸렌글라이콜) (PEG), poly(propylene glycol), 모노-C1-C10 알콕시-PEGs (예컨대, 모노에톡시-PEG), 트레실 모노메톡시-PEG, 아릴옥시-PEGs, PEG 아크리레이트 (PEGA), PEG 메타크리레이트, PEG 프로피오날데하이드, bis-숙신이미딜 카보네이트 PEG, 2-메타크릴옥시에틸-포스포릴콜린 (MPC) 및 N-비닐 피롤리돈 (VP)의 코폴리머, 히드록시 기능성 폴리 (N-비닐 피롤리딘) (PVP), SIS-PEG (SIS는 폴리스티렌-폴리이소부틸렌-폴리스티렌 블럭 코폴리머이다), 폴리스티렌-PEG, 폴리이소부티렌-PEG, PCL-PEG (PCL는 폴리카프로락탐), PLA-PEG (PLA는 폴리락틱산), PMMA-PEG (PMMA는 폴리(메틸 메타크리레이트)), PDMS-PEG (PDMS는 폴

리디메틸옥사논), PVDF-PEG (PVDF는 폴리비닐 플로라이드), PLURONIC™ 계면활성제 (폴리프로필렌-co-폴리에틸렌 글라이콜), 폴리(테트라메틸렌 글라이콜), poly(L-리신-g-에틸렌 글라이콜) (PLL-g-PEG), 폴리(L-리신-g-히아루로닉 산) (PLL-g-HA), 폴리(L-리신-g-포스포릴 콜린) (PLL-g-PC), 폴리(L-리신-g-비닐 피롤리딘) (PLL-g-PVP), 폴리(에틸이민-g-에틸렌 글라이콜) (PEI-g-PEG), 폴리(에틸이민-g-히아루로닉 산) (PEI-g-HA), 폴리(에틸이민-g-포스포릴 콜린) (PEI-g-PC), 폴리(에틸이민-g-비닐 피롤리딘) (PEI-g-PVP), PLL-co-HA, PLL-co-PC, PLL-co-PVP, PEI-co-PEG, PEI-co-HA, PEI-co-PC, PEI-co-PVP, 셀룰로오즈 또는 그의 유도체 (예컨대, 히드록시에틸 셀룰로오즈), 덱스트란, 덱스트린, 히아루로닉 산 및 그의 유도체 (예컨대, 소듐 히아루로네이트), 엘라스틴, 키토산, 아크리릭 설페이트, 아크리릭 설포네이트, 아크리릭 설파메이트, 메타크릭 설페이트, 메타크릭 설포네이트, 메타크릭 설파메이트, 그의 폴리머 및 코폴리머, 및 그의 조합의 폴리머 및 코폴리머를 포함한다.

[0729] 구체적인 구현예에서, 상기 친수성 폴리머는 폴리(에틸렌 글라이콜) (PEG)이고, 폴리(에틸렌 옥사이드) (PEO)라고도 불린다. 본 명세서에서 사용한 것과 같이, 상기 용어 "PEG" 또는 "PEO" 는 가지 친 및 가지 치지 않은 모든 형태의PEG를 포함하는 것이고, 이것은 폴리펩티드의 유도체로 이용될 수 있으며 모노-(C_1-C_{10})알콕시-PEGs 및 아릴옥시-PEGs를 제한 없이 포함한다.

[0730] 일 구현예에서, 상기 PEG-CNP 컨쥬게이트는 상기 구조식 $(CH_2CH_2O)_\xi$의 PEG (또는 PEO) 폴리머를 포함하고, 여기에 있어서, n은 약 6 내지 약 100 사이의 정수이고, PEG 폴리머는 약 0.3 kDa 내지 약 5 kDa의 크기를 가진다. 다른 구현예에서, n은 약 12 내지 약 50 사이의 정수이고, PEG 폴리머는 약 0.6 kDa 내지 약 2.5 kDa의 크기를 가진다. 또 다른 구현예에서, n은 약 12 내지 약 24 사이의 정수이고, PEG 폴리머는 약 0.6 kDa 내지 약 1.2 kDa의 크기를 가진다. 추가적인 구현예에서, PEG 폴리머의 상기 말단의 히드록실기는 비반응성기로 캡핑되어 있다. 구체적인 구현예에서 상기 말단-캡핑기는 알킬기이고, 예컨대 메틸과 같은 저급 알킬이고, 따라서 상기 PEG 폴리머는 알콕시기에서 종결된다. 일 구현예에서, 상기 PEG 폴리머는 가지치지 않는다. 다른 구현예에서, CNP22 또는 그의 변이체은 오직 N-말단에서 PEG 폴리머로 컨쥬게이트된다.

[0731] PEG 및 PEO는 분자량으로 분포되는 분자를 포함할 가능성이 있는데, 그것들은 준비되는 과정에 의존하여 다분산될 가능성이 있다. 폴리머릭 준비에 있어서 상기의 크기/질량 분포는 그것의 중량 평균 분자량 (M_ψ) 및 수 평균 분자량 (M_ξ)에 의하여 통계적으로 특징지어질 수 있고, 이것의 비율을 다분산지수 (M_ψ/M_ξ)라고 부른다. M_ψ 및 M_ξ는 질량 스펙트럼으로 측정될 수 있다. 1.5 kDa보다 큰 PEG 모이어티로 컨쥬게이트된 PEG-CNP 변이체는 모 PEG 분자의 다분산된 성질 때문에 분자량 범위를 나타낼 수 있다. 예를 들어, mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF Co.)의 경우에 있어서, PEG 분자의 분자 질량은 약 1.5 kDa 내지 약 3 kDa의 범위로 분산되고 다분산지수는 1.036이다. 반면에, Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois)사의 상기 $MS(PEG)_\xi$ 시약 (n은 4, 8, 12 또는 24이고, "PEO12" EH는 "PEO24"로 표시된다)을 이용하여 CNP22 또는 그의 변이체과 컨쥬게이트된 PEG는 단분산되고, 별개의 사슬 길이를 가지고 분자량으로 정의된다.

[0732] PEG 모이어티를 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 방법은 당업계에 알려져 있다 (US Patent 5,824,784 참고). PEG화된 CNP 펩티드를 준비하는 방법은 일반적으로 (a) CNP22 또는 그의 변이체을 PEG와 상기 CNP 펩티드를 부착하기 적절한 조건에서 PEG화 시약으로 반응시키는 단계 (예컨대, N-말단에서), 및 (b) 생성물을 얻는 단계를 포함한다. CNP 펩티드의 PEG화는 PEG 모이어티의 사이즈 및 PEG화된 위치에 따라서 NPR-B에 대한 그것의 결합력을 현저히 변경시키기 때문에, 다른 종류의 PEG 및 PEG화 반응 조건이 개발될 수 있다. CNP 펩티드의 PEG화를 위하여 사용될 수 있는 화합물은 메톡시-PEG (O-[(N-숙신이미딜옥시카보닐)-메틸]-O'-메틸폴리에틸렌 글라이콜)의 NHS-에스터를 이용하는 펩티드의 반응성 있는 1차 아민의 아실화를 포함한다. 메톡시-PEG-NHS 또는 메톡시-PEG-SPA로의 아실화는 원래 1차 아민의 어떤 전하를 제거하는 아미드 연결을 가져온다.

[0733] "PEO12" 또는 "PEO24"의 표시로 지정되었을 뿐만 아니라, "PEG1K", "PEG2K", "PEG5K" 또는 "PEG20K"의 표시로 지정된 PEG-CNP 펩티드는, 펩티드 상의 1차 아민기와 NHS-에스터, 활성화된 메톡시-말단 캡핑된 PEG 시약과의 반응으로 PEG화된다.

[0734] PEG-CNP 변이체는 또한 다른 방법으로 준비될 수 있는데, 예를 들어 펩티드 상에서 1차 아미노기와 PEG-프로피오날데하이드, 또는 그의 모노-C_1-C_{10} 알콕시 또는 아릴 옥시 유도체 (U.S.Patent5,252,714 참조)와 같은 PEG 알데하이드와의 환원성 아민화를 통하여 얻어질 수 있다.

[0735] 리보솜 단백질 합성과 다르게, 합성 펩티드의 합성은 C-말단으로부터 N-말단으로 진행한다. 따라서, Boc-PEG (tert-부틸옥시카보닐 (Boc)을 포함하는)는 PEG를 펩티드의 C-말단에 부착하는 하나의 방법이다 (R. B.

Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85(14): 2149-2154 (1963)). 그렇지 않으면, Fmoc (플로레닐메톡시카보닐) 화학을 이용할 수 있다 (E. Atherton and R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, IRL Press (Oxford, England (1989)).

[0736] PEG-CNP 변이체를 준비하는 본 방법은 실질적으로 폴리머-단백질 컨쥬게이트의 균일한 혼합물을 제공한다. 정제 후, 별개의 PEG-CNP의 제조는 생체외 내 또는 생체 내의 생물학적 성질의 시험에 있어서 충분히 순수하다. 본 명세서에서 기재한 바와 같이, 어떤 PEG-CNP 변이체는 NEP 절단에 대하여 감소된 감수성을 보이고 실질적으로 비슷하거나 더 나은 기능성을 보인다 (예컨대, cGMP 생산의 자극).

[0737] 본 명세서에서 기재한 바와 같이, 적절한, PEG화 시약/CNP 펩티드의 비율 및 반응 조건을 사용하는 CNP22 또는 그의 변이체의 PEG 반응은 PEG-CNP 유도체를 제공한다. 상기 PEG화의 성질과 범위는 예컨대 PAGE 및 HPLC 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 어떤 구현예에서, 최소한 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 CNP22 또는 그의 변이체는 N-말단에서 모노-PEG화된다. CNP 펩티드의 생물학적 성질에 있어서 PEG화의 이로운 효과를 최적화시키기 위하여, 상기 폴리머 길이, 형태 (예컨대, 가지 있거나 또는 직쇄), 및/또는 PEG 모이어티의 작용기 (예컨대, 음전하로 하전된 기의 추가)는 다양할 수 있다. PEG화된 CNP 변이체는 NEP 저항성, 약물동태학 및 생물활성 (예컨대, NPR-B에 결합하고 cGMP의 생성을 자극하는 능력)에 대하여 시험되었다. 향상된 NEP 저항성 및 최소 50% CNP22의 cGMP-자극 활성을 보이는 PEG화된 CNP 변이체는 예를 들어 생체외 내에서 래트 연골육종 세포-기초 연뼈 무형성증 모델 및 생체 내에서 뮤린 연골무형성증 동물 모델을 이용하여 더 연구될 수 있다.

[0738] **E. CNP 변이체의 사용 방법, CNP 변이체의 제약 조성물, 및 투여 경로**

[0739] **CNP 변이체의 사용 방법**

[0740] 뼈-관련 질병

[0741] 섬유아세포 성장인자(FGF)는 뼈 형성에 중요한 역할을 하며, FGF 수용체 유전자(FGFR 1, 2 및 3)의 돌연변이는 여러 유전성 골격 형성장애를 일으킨다(Curr. Biol., 5:500-507(1995)). 특히, FGFR-3의 활성화 돌연변이는 장골의 장애를 초래하는데, 여기에는 사람의 가장 흔한 형태의 유전적 왜소증인 연골무형성증(Nature, 371:252-254(1994); Cell 78:335-342(1994)), 경증 장애인 연골형성저하증(Ann. N. Y. Acad. Sci., 785:182-187(1996)) 및 더 중증이며 신생아에게 치명적인 제I형 및 제II형 치사성 이형성증(TD)(Hum. Mol. Genet., 5:509-512(1996); Nat. Genet., 9: 321-328(1995))이 포함된다. FGF-2를 과발현하고, 그로 인해 FGFR-3을 활성화하는 마우스 모델은 단축된 장골과 대두증을 나타낸다(Mol. Biol. Cell, 6:1861-73(1995)). 이 모델과 일치하여, FGFR-3에 결함을 가진 마우스는 넓어진 성장판을 동반한 현저한 골격 과성장을 나타낸다(Nature Genet., 12:390-397(1996)).

[0742] CNP, NPR-B 및 NPR-C를 사용한 보완 실험은 펩티드 리간드와 상응하는 수용체와 뼈 성장 사이의 연결성을 시사한다. 트랜스젠 마우스에서 CNP의 상승된 혈장 농도로 인한 NPR-B의 활성화는 FGFR-3 녹아웃 마우스(Nat. Genet., 4: 390-397(1996))의 성장판 연골과 조직학적으로 유사한 골격 과성장(Nat. Med., 10: 80-86(2004))을 일으킨다. NPR-C 녹아웃 마우스에서, CNP의 NPR-C-매개 제거는 없어져야 한다. 이런 예측과 일치하여, 녹아웃 동물은 신장된 장골과 후만증을 동반한 신장된 척추를 나타낸다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7403-08(1999)). 반면에, CNP 녹아웃 마우스는 단축된 장골과 척추로 인해 왜소화되는데, 이것은 연골무형성증과 조직학적으로 유사한 표현형이며, 작아진 흉곽으로 인한 흡장장애 및 폐 제한의 결과로서 사망률이 증가했다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:4016-4021 (2001)). NPR-B의 활성제로서 제안된 CNP의 역할과 일치하여, NPR-B 녹아웃 마우스는 CNP 녹아웃 마우스와 동일한 왜소화된 골격 표현형 및 증가된 사망률을 가진다(Proc. Natl. Acad. Sci USA, 101:17300-05 (2004)). 또한, 연골에 활성화된 FGFR-3이 존재하는 연골무형성증의 마우스 모델에서는, 연골세포에서 CNP의 표적화된 과발현이 왜소증을 상쇄한다(Yasoda et al., Nat. Med., 10:80-86 (2004)). 추가로, CNP는 연골내 뼈 성장 및 연골세포 활성을 조절하는데 역할을 하는 것으로 나타났으며, 여기에는 제한은 아니지만 연골세포 증식 및 분화, 미토겐 활성화 단백질(MAP) 키나제/MEK(Raf-1) 키나제 신호화 경로의 억제, 및 연골내 골화의 촉진이 포함된다(Yasoda et al., Nat. Med., 10:80-86 (2004)). 이들 결과는 CNP/NPR-B 시스템의 활성화가 사람 연골무형성증의 치료를 위한 잠재적인 치료 전략임을 시사한다.

[0743] 바탕질 생산, 연골세포의 증식 및 분화를 자극하고, 장골 성장을 증가시킴으로써, 본 발명의 CNP 변이체는 골격 이형성증과 같은 뼈-관련 질병에 걸린 사람을 포함하는 포유류를 치료하는데 유용하다. CNP-반응성 뼈-관련 질병 및 골격 이형성증의 비제한적 예는 연골무형성증, 연골형성저하증, 저 신장, 왜소증, 골연골이형성증, 치사성 이형성증, 골형성부전증, 연골무발생증, 점상연골형성장애, 연골발육부전, 점상연골형성장애, 굴지형성이상,

선천성 치사성 저인산증, 선천성 치사성 골형성부전, 짧은갈비뼈 다지증 증후군, 연골저형성증, 점상연골이형성증, 젠슨형 골간단이형성증, 선천성 척추골단이형성증, 무지증, 이영양성 형성이상, 선천성 대퇴골단축증, 랭거형 전완부이형성증, 니버겔트형 전완부이형성증, 로비나우 증후군, 선단이골증, 말초골형성부전, 니스트 형성이상, 파이브로콘드로제네시스, 로버트 증후군, 전완하퇴말단의 형성이상, 소지증, 모르큐 증후군, 니스트 증후군, 유기영양 이형성증 및 척추골단골간단 이형성증을 포함한다. 또한, CNP 변이체는 특발성 저신장증 및 다른 골격 이형성증의 치료를 위한 성장 호르몬의 보조제 또는 대체제로서 유용하다.

[0744] 또한, CNP 변이체는 다른 뼈-관련 상태 및 질병, 예를 들어 구루병, 저인산혈성 구루병[X-연결 저인산혈성 구루병(비타민 D-내성 구루병이라고 한다) 및 상염색체 우성 저인산혈성 구루병을 포함한다], 및 골연화증[종양-유발 골연화증(암성 골연화증 또는 암성 저인산혈성 골연화증이라고 한다)을 포함한다]을 치료하는데 유용하다.

[0745] 또한, 본 발명의 CNP 변이체는 골관절염을 치료하는데도 사용될 수 있다. 골관절염은 노인층에서 빈번히 발생하는 관절 연골의 퇴행성 질환이다. 골관절염은 관절 성분들의 변성으로 인한 연골의 파괴와 뼈와 연골의 증식성 변화를 수반하며, 이러한 변화는 2차 관절염(예를 들어, 활막염)을 가져온다. 골관절염에서는 연골의 기능 물질인 세포외 바탕질 단백질이 감소되고, 연골세포의 수가 감소한다(Arth. Rheum. 46(8):1986-1996(2002)). 바탕질 생산, 연골세포의 성장 및 분화를 촉진함으로써, CNP 변이체는 FGF-2의 바람직하지 않은 효과를 상쇄하고, 골관절염을 포함하는 관절염에 걸린 대상에서 바탕질 합성을 증가시키는데 유용하며, 이로써 골관절염을 포함하여 관절염을 치료할 수 있다.

[0746] 혈관 평활근 질병

[0747] CNP 및 다른 혈관활성 펩티드들(ANP, BNP 및 유로딜라틴)은 혈관확장제 및 이뇨제의 특성을 가지며, 심혈관 항상성에서 중요한 역할을 한다(J. Cardiovasc. Pharmacol., 117:1600-06(1998); Kidney Int., 49:1732-37(1996); Am.J. Physiol., 275:H1826-1833(1998)). CNP는 심혈관계에 광범하게 분포되며, 특히 혈관 내피세포에 높은 농도로 존재한다(J. Cardiovasc. Pharmacol., 117:1600-06(1998)). CNP는 혈관 평활근, 특히 관상 순환계의 효력 있는 이완제이며(Biochem. Biophys. Res. Commun., 205:765-771 (1994)), 평활근 세포 증식의 억제제이다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 177:927-931 (1991)). CNP의 혈관확장 효과는 ANP의 효력보다는 덜하지만(약 1:100)(Hypertens. Res., 21:7-13 (1998); Am. J. Physiol., 275: L645-L652 (1998)), CNP mRNA가 전단 변형에 반응하여 증가되고(FEBS Lett., 373:108-110 (1995)), 염증성 심혈관 병리상태에서는 CNP의 혈장 수준이 상승된다(Biochem. Biophys. Res. Commun., 198:1177-1182 (1994)). CNP는 토끼의 손상된 경동맥에서 대식세포 침윤의 억제를 통해 염증을 억제하고(Circ. Res., 91:1063-1069 (2002)), NPR-B/cGMP-의존성 경로를 통해 심장 섬유아세포 증식을 직접 억제하는 것으로 밝혀졌다(Endocrinology, 144:2279-2284 (2003)).

[0748] CNP의 심혈관 작용은 NPR 서브타입인 NPR-B와 NPR-C의 활성화를 통해 매개되며(Endocrinology, 130:229-239 (1992)), NPC-C가 생체내에서 발현되는 NPR의 95%를 차지한다(Science, 293:1657-1662 (2001)). CNP/NPR-B 경로는 심혈관계의 잘 확립된 2차 메신저인 cGMP의 상승을 유도한다. NPR-C의 C-말단에서부터 37-아미노산 부분은 헤테로트라이머인 G 단백질 Gi과 상호작용하는 컨센서스(consensus) 서열을 가지며(J. Biol. Chem., 274:17587-17592 (1999)), 이것은 아데닐레이트 시클라제 및 포스포리파제 C 활성을 조절하는 것으로 밝혀졌다(J. Biol. Chem., 276: 22064-22070 (2001); Am.J. Physiol., 278:G974-980 (2000); J. Biol. Chem., 271: 19324-19329 (1996)). CNP는 NPR-C의 활성화와 G 단백질-조절 내부 정류 K^+ 채널의 개방을 통해 평활근 초편극화와 이완을 매개한다(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:1426-1431(2003)). 마찬가지로, CNP는 심장 섬유아세포에서 중요한 항증식 효과를 가지고, NPR-C와의 상호작용을 통해서 평활근 세포를 초편극화함으로써 국소 혈류 및 전신 혈압을 조절한다(R. Rose and W. Giles, J. Physiol. 586:353-366 (2008)).

[0749] 혈관 평활근 세포와 결합함으로써, CNP22는 cGMP의 생산을 자극하며, 이것은 세포내 2차 메신저로서 작용하여 궁극적으로는 혈관의 이완을 일으킨다. CNP의 저혈압성 작용에 기초하여, 본 발명의 CNP 변이체는 고혈압, 울혈성 심부전, 심장 부종, 신수종, 간 부종, 급성 및 만성 심부전증 등을 치료하는데 유용하다. 또한, cGMP 신호화의 활성화는 혈관 평활근 세포의 성장을 억제한다. 따라서, 본 발명의 CNP 변이체는, 제한은 아니지만 재협착 및 동맥경화증을 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 성장에 의해 야기되는 상태 또는 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0750] 상기 설명된 연구들은 CNP가 혈관 평활근의 이완 및 재구축을 위한 잠재적인 치료제 후보일 수 있음을 시사한다. 특정 질병에 관한 CNP의 제약 효과는 부분적으로는 혈관확장 활성보다는 혈관보호 효과로 인한 것이었다(Am. J. Respir. Crit. Care Med., 170: 1204-1211(2004)). 따라서, 본 발명의 CNP 변이체들은 CNP가 혈관보호 효과를 가질 수 있는 혈관 평활근 장애와 같은 상태를 치료하는데 유용하며, 여기에는 제한은 아니지만

평활근의 이완을 유도하고, 심장 조직에 대식세포가 침윤되는 것을 억제하는 것이 포함된다. 한 구체예에서, CNP 변이체는 제한은 아니지만, 급성 비대상성 심부전 및 급성 울혈성 심부전을 포함하는 심부전을 치료하는데 사용된다. 다른 구체예에서, CNP 변이체들은 천식, 심근병증, 및 관상동맥 재협착을 치료하는데 사용된다(평활근 세포 이완을 증가시키고, 평활근 세포 증식을 감소시킴으로써).

[0751] **CNP 변이체의 제약 조성물**

[0752] 추가의 구체예에서, 본 발명의 CNP 변이체, 및 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제, 담체 및/또는 희석제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 특정 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 다른 생물학적 활성제(예를 들어, 프로테아제 억제제, 수용체 티로신 키나제, 및/또는 제거 수용체 NPR-C)를 더 포함한다.

[0753] 어떤 구체예에서, 조성물은 원하는 CNP 변이체를 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 순도로 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 다른 포유동물(예를 들어, 사람)의 단백질 및 다른 CNP 변이체들과 같은 거대분자 오염물질을 약 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0.5% 미만으로 함유한다.

[0754] 부형제, 담체 및 희석제의 비제한적 예는 비히클, 액체, 버퍼, 등장제, 첨가제, 안정제, 보존제, 용해제, 계면활성제, 유화제, 습윤제, 애쥬번트 등을 포함한다. 조성물은 액체(예를 들어, 물, 에탄올); 다양한 버퍼 성분, pH 및 이온강도의 희석제(예를 들어, 트리스-HCl, 인산염, 아세트산염 버퍼, 시트르산염 버퍼); 세제 및 용해제(예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80); 항산화제(예를 들어, 메티오닌, 아스코르브산, 나트륨 메타바이술파이트); 보존제(예를 들어, 티메로살, 벤질알코올, m-크레졸); 및 증량제(예를 들어, 락토오스, 만니톨, 수크로오스)를 함유할 수 있다. 제약 조성물의 제제에 부형제, 희석제 및 담체를 사용하는 것은 본 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 본원에 참고자료로 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., p. 1435-1712, Mack Publishing Co.(Easton, Pennsylvania(1990))를 참조한다.

[0755] 예를 들어, 담체는 제한은 아니지만 희석제, 비히클 및 애쥬번트, 뿐만 아니라 이식물 담체, 및 불활성, 비독성 고체 또는 액체 필러, 및 활성 성분(들)과 반응하지 않는 캡슐화 재료를 포함한다. 담체의 비제한적 예는 인산염 완충 식염수, 생리학적 식염수, 물 및 에멀젼(예를 들어, 오일/물 에멀젼)을 포함한다. 담체는, 예를 들어 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 기름 및 이들의 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0756] 어떤 구체예에서, 조성물은 액체 제제이다. 어떤 구체예에서, 제제는 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 또는 약 0.5 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 또는 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 또는 약 0.1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 또는 약 0.5 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 또는 약 1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml의 농도 범위로 CNP 변이체를 포함한다.

[0757] 추가의 구체예에서, 조성물은 CNP-함유 용액 또는 현탁액의 pH를 바람직한 범위로 유지하기 위한 버퍼 용액 또는 완충제를 포함한다. 버퍼 용액의 비제한적 예는 인산염 완충 식염수, 트리스 완충 식염수, 및 Hank 완충 식염수를 포함한다. 완충제는, 제한은 아니지만 아세트산 나트륨, 인산나트륨 및 시트르산 나트륨을 포함한다. 완충제의 혼합물도 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 완충제는 아세트산/아세트산염 또는 시트르산/시트르산염이다. 조성물 중의 적합한 완충제의 양은 사용된 특정 버퍼 및 용액이나 현탁액의 바람직한 pH에 일부분 좌우된다. 예를 들어, 아세트산염은 pH 6보다 pH 5에서 더 효과적인 pH 버퍼이므로, pH 6보다 pH 5에서 더 적은 아세트산염이 용액 중에 사용될 수 있다. 어떤 구체예에서, 완충제는 약 10mM±5mM의 농도를 가진다. 특정 구체예에서, 조성물의 pH는 약 pH 3 내지 약 pH 7.5, 또는 약 pH 3.5 내지 약 pH 7, 또는 약 pH 3.5 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 4 내지 약 pH 6, 또는 약 pH 4 내지 약 pH 5, 또는 약 pH 5.0±1.0이다.

[0758] 다른 구체예에서, 조성물은 용액이나 현탁액을 등장성으로 만들어 주사에 더 적합하게 하는 등장성 조절제를 함유한다. 등장성 조절제의 비제한적 예는 NaCl, 덱스트로오스, 글루코오스, 글리세린, 소르비톨, 크실리톨 및 에탄올을 포함한다. 특정 구체예에서, 등장성 조절제는 NaCl이다. 특정 구체예에서, NaCl의 농도는 약 160±20mM, 또는 약 140mM±20mM, 또는 약 120±20mM, 또는 약 100mM±20mM, 또는 약 80mM±20mM, 또는 약 60 mM±20mM이다.

[0759] 또 다른 구체예에서, 조성물은 보존제를 포함한다. 보존제는, 제한은 아니지만 m-크레졸 및 벤질알코올을 포함한다. 특정 구체예에서, 보존제의 농도는 약 0.4%±0.2%, 또는 약 1%±0.5%, 또는 약 1.5%±0.5%, 또는 약 2.0%±0.5%이다.

[0760] 또 다른 구체예에서, 조성물은 흡착방지제를 함유한다(예를 들어, 유리나 플라스틱에 CNP 변이체가 흡착되는 것을 완화하기 위한). 흡착방지제는, 제한은 아니지만 벤질알코올, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80을 포함한다. 특정 구체예에서, 흡착방지제의 농도는 약 0.001% 내지 약 0.5%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.5%, 또는

약 0.1% 내지 약 1%, 또는 약 0.5% 내지 약 1%, 또는 약 0.5% 내지 약 1.5%, 또는 약 0.5% 내지 약 2%, 또는 약 1% 내지 약 2%이다.

[0761] 추가의 구체예에서, 조성물은 안정제를 포함한다. 안정제의 비제한적 예는 글리세린, 글리세롤, 티오글리세롤, 메티오닌, 및 아스코르브산 및 그것의 염을 포함한다. 어떤 구체예에서, 안정제가 티오글리세롤 또는 아스코르브산 또는 그것의 염인 경우, 안정제의 농도는 약 0.1% 내지 약 1%이다. 다른 구체예에서, 안정제가 메티오닌인 경우, 안정제의 농도는 약 0.01% 내지 약 0.5%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.2%이다. 추가의 구체예에서, 안정제가 글리세린인 경우, 안정제의 농도는 약 5% 내지 약 100%(순수)이다.

[0762] 추가의 구체예에서, 조성물은 항산화제를 함유한다. 항산화제의 예는, 제한은 아니지만 메티오닌 및 아스코르브산을 포함한다. 특정 구체예에서, 항산화제 대 CNP 변이체의 몰비는 약 0.1:1 내지 약 15:1, 또는 약 1:1 내지 약 15:1, 또는 약 0.5:1 내지 약 10:1, 또는 약 1:1 내지 약 10:1, 또는 약 3:1 내지 약 10:1이다.

[0763] 제약학적으로 허용되는 염이 조성물에 사용될 수 있으며, 이들은 제한은 아니지만 광물 산 염(예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산), 유기산의 염(예를 들어, 아세트산염, 프로피온산염, 말론산염, 벤조산염, 메실레이트, 토실레이트), 및 아민의 염(예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디시클로헥실아민, 디에탄올아민)을 포함한다. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed, Mack Publishing Company(Easton, Pennsylvania(1990))에 이러한 제약학적으로 허용되는 염에 대해 충분히 논의되어 있다.

[0764] 제약 조성물은 정제, 캡슐, 과립, 분말, 용액, 현탁액, 에멀젼, 연고 및 경피 패치와 같은 다양한 형태로 투여될 수 있다. 조성물의 제형은 조성물의 원하는 투여 방식에 따라 맞춤 제작될 수 있다. 경구 투여의 경우, 조성물은, 예를 들어 정제 또는 캡슐(연질겔 캡슐을 포함한다)의 형태일 수 있거나, 또는 예를 들어 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 또는 시럽일 수 있다. 경구 투여를 위한 정제 및 캡슐은 하나 이상의 통상 사용되는 부형제, 희석제 및 담체, 예를 들어 만니톨, 락토오스, 글루코오스, 수크로오스, 녹말, 옥수수 녹말, 나트륨 사카린, 탈크, 셀룰로오스, 탄산마그네슘, 및 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 스테아릴 푸마레이트)를 포함할 수 있다. 원한다면, 향미제, 착색제 및/또는 감미제가 고체 및 액체 제제에 첨가될 수 있다. 경구 제제를 위한 다른 선택적 성분은, 제한은 아니지만 보존제, 현탁제 및 증점제를 포함한다. 또한, 경구 제제는 위의 산성 환경으로부터 CNP 변이체를 보호하기 위한 장용 코팅을 가질 수 있다. 고체 및 액체 제형을 제조하는 방법은 공지되어 있으며, 당업자에게는 자명할 것이다(예를 들어, 상기 언급된 Remington's Pharmaceutical Sciences 참조).

[0765] 비경구 투여를 위한 제제는, 예를 들어 액체 용액 또는 현탁액으로서, 주사 전에 액체 매질에 용해하거나 현탁하기에 적합한 고체 형태로서, 또는 에멀젼으로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 멸균 주사 용액 및 현탁액이 적합한 희석제, 담체, 용매(예를 들어, 완충된 수성 용액, Ringer 용액, 등장 염화나트륨 용액), 분산제, 습윤제, 유화제, 현탁제 등을 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라서 조제될 수 있다. 또한, 멸균 고정유, 지방 에스테르, 폴리올 및/또는 다른 비활성 성분들이 사용될 수 있다. 추가의 예에서, 비경구 투여를 위한 제제는, 항산화제, 버퍼, 정균제, 및 제제를 의도된 수혜자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 멸균 주사 용액, 및 현탁제 및 증점제를 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다.

[0766] 또한, CNP 변이체를 포함하는 조성물은 동결건조 제제일 수 있다. 특정 구체예에서, 동결건조 제제는 버퍼 및 증량제 그리고 선택적으로 항산화제를 포함한다. 버퍼의 예는, 제한은 아니지만 아세트산염 버퍼 및 시트르산염 버퍼를 포함한다. 벌크화제의 예는, 제한은 아니지만 만니톨, 수크로오스, 덱스트란, 락토오스, 트레할로오스 및 포비돈(PVP K24)을 포함한다. 특정 구체예에서, 만니톨은 약 3% 내지 약 10%, 또는 약 4% 내지 약 8%, 또는 약 4% 내지 약 6%의 양으로 존재한다. 특정 구체예에서, 수크로오스는 약 6% 내지 약 20%, 또는 약 6% 내지 약 15%, 또는 약 8% 내지 약 12%의 양으로 존재한다. 항산화제의 예는, 제한은 아니지만 메티오닌 및 아스코르브산을 포함한다.

[0767] 또한, 본 명세서는, 예를 들어 액체(예를 들어, 멸균 주사용) 제제 또는 고체(예를 들어, 동결건조) 제제를 포함하는 작은 병, 바이알, 앰풀, 튜브, 카트리지 및/또는 주사기를 함유하는 키트를 제공한다. 또한, 키트는, 제한은 아니지만 주사용 주사기에서 동결건조 제제를 복원하거나, 또는 농축물을 저 농도로 희석하는 것을 포함하여, 고체(예를 들어, 동결건조) 제제를 투여(예를 들어, 주사에 의해)를 위해 용액이나 현탁액을 복원하기 위한 제약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체(예를 들어, 용매, 용액 및/또는 버퍼)를 함유할 수 있다. 또한, 즉석 주사 용액 및 현탁액이, 예를 들어 CNP-함유 조성물을 포함하는 멸균 분말, 과립 또는 정제로부터 제조될 수 있다. 또한, 키트는 에어로졸 또는 주사액 디스펜싱 장치, 펜형 인젝터, 오토인젝터, 니들리스(needleless) 인젝터, 주사기 및/또는 바늘과 같은 디스펜싱 장치를 포함할 수 있다.

[0768] 비제한적 예로서, 키트는 단일 챔버 또는 이중 챔버를 갖는 주사기를 포함할 수 있다. 단일 챔버 주사기의 경우, 단일 챔버는 바로 주사할 수 있는 액체 CNP 제제를 함유하거나, 또는 고체(예를 들어, 동결건조) CNP 제제 또는 비교적 소량의 적합한 용매 시스템(예를 들어, 글리세린)에 용해된 CNP 변이체의 액체 제제를 함유할 수 있으며, 이들은 주사용 용액이나 현탁액으로 복원될 수 있다. 이중 챔버 주사기의 경우, 1개 챔버는 제약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체(예를 들어, 용매 시스템, 용액 또는 버퍼)를 함유할 수 있고, 다른 챔버는 고체(예를 들어, 동결건조) CNP 제제 또는 비교적 소량의 적합한 용매 시스템(예를 들어, 글리세린)에 용해된 CNP 변이체의 액체 제제를 함유할 수 있으며, 이들은 제 1 챔버의 비히클이나 담체를 사용하여 주사용 용액이나 현탁액으로 복원될 수 있다.

[0769] 추가의 예로서, 키트는 하나 이상의 펜형 인젝터 또는 오토인젝터 장치, 및 이중 챔버 카트리지를 포함할 수 있다. 카트리지의 1개 챔버는 제약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체(예를 들어, 용매 시스템, 용액 또는 버퍼)를 함유할 수 있고, 다른 챔버는 고체(예를 들어, 동결건조) CNP 제제 또는 비교적 소량의 적합한 용매 시스템(예를 들어, 글리세린)에 용해된 CNP 변이체의 액체 제제를 함유할 수 있으며, 이들은 제 1 챔버의 비히클이나 담체를 사용하여 주사용 용액이나 현탁액으로 복원될 수 있다. 카트리지는 원하는 시간 기간에 걸쳐 투약하기에 충분한 양의 CNP 변이체를 포함할 수 있다(예를 들어, 1일, 2일, 3일, 1주, 2주, 3주, 4주 등). 펜형 인젝터나 오토인젝터는 카트리지로부터 원하는 양의 CNP 제제를 투여하도록 조정될 수 있다.

[0770] 또한, CNP 변이체를 포함하는 제약 조성물은 서방형, 제어 방출형 또는 지속 방출형 시스템으로서 제제화될 수 있으며, 이로써 원하는 시간 기간에 걸쳐, 예를 들어 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 또는 3개월에 걸쳐 비교적 일정한 수준의 투약을 유지할 수 있다. 서방형, 제어 방출형 및 지속 방출형 제제는, 예를 들어 생분해성 중합체 시스템{이것은, 예를 들어 친수성 중합체[예를 들어, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리(락티드-글리콜리드)]를 포함할 수 있다}를 사용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어 본 분야에 공지된 대로 마이크로입자, 마이크로스피어 또는 리포솜의 형태를 가질 수 있다.

[0771] **투약량 및 투약 빈도**

[0772] 본원에서 사용된 용어 활성제(예를 들어, CNP 변이체)의 "치료적 유효량"은 환자에게 치료적 이익을 제공하는 양을 말한다. 이 양은 대상마다 다를 수 있으며, 환자의 전체적인 신체 상태를 포함하는 여러 요인들에 좌우될 수 있다. CNP 변이체의 치료적 유효량은 공개적으로 입수할 수 있는 재료 및 과정을 이용하여 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있다. 예를 들어, 치료에 사용되는 CNP 변이체의 양은 연골무형성증을 가진 0~17세 아동들의 성장 차트(여아 214명, 남아 189명)에 기초하여 허용되는 성장 속도를 제공해야 하며, 이 차트에는 연령별 키, 머리둘레 및 부위별 성장이 기록된다(Horton WA et al., Standard growth curves for achondroplasia, J. Pediatr., 93: 435-8(1978)). CDC 차트를 이용하여 연령에 따른 체중과 신장에 따른 체중 또는 연령에 따른 BMI를 평가할 수 있다. 또한, 자연스런 상황에서 장기간 진행되는 과정에서 나타나는 2차 성과도 측정될 수 있다.

[0773] 야생형 CNP22보다 긴 혈청 반감기를 가진다면, CNP 변이체는 CNP22보다 덜 빈번하게 투여되는 것이 가능할 수 있다. 특정 대상에 대한 투약 빈도는 치료될 장애 및 치료법에 따른 대상의 상태 및 반응을 포함하는 여러 요인들에 따라서 변할 수 있다. 특정 구체예에서, CNP 변이체를 함유하는 제약 조성물은 약 하루 1회, 2일에 1회, 3일에 1회 또는 매주 1회의 빈도로 대상에게 투여된다. 한 구체예에서, 뼈-관련 질병(예를 들어, 연골무형성증을 포함하는 골격 이형성증)의 치료를 위해서는, 성인이 될 때까지 및/또는 성인기 내내 환자에게 CNP 변이체의 용량이 매일 또는 매주 투여된다.

[0774] 본원에 설명된 CNP 변이체는 뼈-관련 질병(예를 들어, 연골무형성증을 포함하는 골격 이형성증) 및 CNP가 혈관 보호 효과를 제공할 수 있는 상태(예를 들어, 혈관 평활근 장애)를 치료하거나, 완화하거나, 또는 예방할 수 있는 치료적 유효량으로 환자에게 투여될 수 있다. CNP 변이체의 안정성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물을 대상으로 표준 약물학적 과정에 의해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 LD_{50}(집단의 50%에 치사량인 용량) 및 ED_{50}(집단의 50%에서 치료적으로 유효한 용량)을 결정함으로써 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비를 치료 지수라 하며, LD_{50}/ED_{50}의 비로써 표시될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 활성제가 일반적으로 바람직하다.

[0775] 세포 배양물 분석과 동물 연구로부터 얻어진 데이터를 사용하여 사람에서 사용하기 위한 투약량 범위를 공식화할 수 있다. 투약량은 일반적으로 ED_{50}을 포함하며, 독성은 거의 없거나 전혀 없는 일정 범위의 순환 농도 내에서 정해진다. 투약량은 사용되는 제형 및 이용되는 투여 경로에 따라서 이 범위 내에서 변할 수 있다. 치료적

유효량도 세포 배양물 분석 및 동물 연구로부터 결정될 수 있다.

[0776] 특정 구체예에서, 본원에 설명된 CNP 변이체는 약 5 또는 10 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 또는 약 20 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg의 범위에서 정해지는 용량으로 투여된다. 어떤 구체예에서, CNP 변이체는 약 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 또는 2000 nmol/kg의 용량으로, 또는 치료 의사가 적절하다고 판단하는 다른 용량으로 투여된다. 다른 구체예에서, CNP 변이체는 약 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 또는 1000 ug/kg의 용량으로, 또는 약 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 또는 10 mg/kg의 용량으로, 또는 치료 의사가 적절하다고 판단하는 다른 용량으로 투여된다. 본원에 설명된 CNP 변이체의 용량들은, 제한은 아니지만 매일, 매주 2 또는 3회, 매주, 2주마다, 3주마다, 매달 투여하는 것 등을 포함하는 본원에 설명된 투약 빈도/투여 빈도에 따라서 투여될 수 있다.

[0777] 특정 대상에 대한 CNP 변이체의 투약/투여 빈도는 치료될 질병 및 치료법에 따른 대상의 상태 및 반응을 포함하는 여러 요인들에 따라서 변할 수 있다. CNP 변이체는 투약 당 단일 용량으로 또는 다수 용량으로 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, CNP 변이체는 매일, 격일로, 3일마다, 매주 2회, 매주 3회, 매주, 격주, 3주마다, 매달, 6주마다, 2개월마다, 3개월마다, 또는 치료 의사가 적절하다고 판단하는 대로, 단일 용량으로 또는 다수 용량으로 투여된다.

[0778] 어떤 구체예에서, CNP 변이체는 성장(예를 들어, 연골형성) 기간과, 이어지는 회복(예를 들어, 골형성) 기간이 허용되도록 투여된다. 예를 들어, CNP 변이체가 일정 기간 동안 매일 또는 매주 수회 정맥내, 피하 또는 다른 투여 방식으로 투여될 수 있고, 이후에 치료가 없는 기간이 이어지며, 이 사이클이 반복된다. 어떤 구체예에서, 초기 치료 기간(예를 들어, 매일 또는 매주 수회 CNP 변이체의 투여)은 2일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주 또는 12주 동안이다. 관련된 구체예에서, 치료가 없는 기간은 3일, 1주, 2주, 3주 또는 4주 동안 지속된다. 특정 구체예에서, CNP 변이체의 투약 섭생은 3일간 매일 투여하고 3일간 휴식; 또는 1주일간 매일 또는 매주 수회 투여하고 3일 또는 1주 휴식; 또는 2주일간 매일 또는 매주 수회 투여하고, 이후 1주 또는 2주 휴식; 또는 3주일간 매일 또는 매주 수회 투여하고, 이후 1주, 2주 또는 3주 휴식; 또는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주간 매일 또는 매주 수회 투여하고, 이후 1주, 2주, 3주 또는 4주 휴식하는 것이다.

[0779] **투여 방식**

[0780] CNP 변이체, 또는 그것을 포함하는 제약 조성물은 다양한 방식으로, 예를 들어 피하, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피내, 또는 경막내 주사에 의해서 대상에게 투여될 수 있다. 한 구체예에서, CNP 변이체는 하루 1회의 단일 피하, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피내 또는 경막내 주사에 의해서 투여된다.

[0781] 또한, CNP 변이체는 질환 부위에 또는 근처에 직접 주사함으로써 투여될 수 있다. 또한, CNP 변이체는 표적 작용 부위(예를 들어, 비정상 또는 이형성 뼈)에 데포(depot)를 이식함으로써 투여될 수 있다. 대안으로서, CNP 변이체는 혀 밑에 설하 경로로 투여되거나, 또는 폐 흡인, 비강 송달(예를 들어, 비내 스프레이), 눈 송달(예를 들어, 점안제), 또는 경피 송달(예를 들어, 피부 패치에 의해서)에 의해서 투여될 수 있다. 또한, CNP 변이체는 마이크로스피어, 마이크로캡슐, 리포솜(하전되지 않은 또는 하전된(예를 들어, 양이온성)), 중합체 마이크로입자(예를 들어, 폴리아미드, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리(락티드-글리콜리드)), 마이크로에멀젼 등의 형태로 경구 투여될 수 있다.

[0782] 또 다른 투여 방법은 삼투 펌프(예를 들어, Alzet 펌프) 또는 미니-펌프(예를 들어, Alzet 미니-삼투 펌프)에 의한 것인데, 이것은 정해진 기간에 걸쳐서 CNP 변이체가나 제약 조성물을 제어, 연속 및/또는 지연 방출 방식으로 송달할 수 있다. 삼투 펌프 또는 미니 펌프는 피하 이식되거나, 또는 표적 부위(예를 들어, 팔다리의 장골, 성장판 등) 근처에 이식될 수 있다.

[0783] 상기 설명된 대로, CNP 변이체를 사용하여, 제한은 아니지만 재협착 및 동맥경화증을 포함하는 혈관 평활근 세포의 이상 성장에 의해 야기되는 상태 또는 질환을 치료할 수 있다. 침범된 체내 맥관(예를 들어, 혈관)으로 CNP 변이체를 국소 송달하기 위해서, CNP 변이체는 질환 부위에 이식된 의료 장치(예를 들어, 스텐트)에 의해 송달될 수 있다. 한 구체예에서, CNP 변이체는 스텐트 위에 배치되는 중합체 매트릭스 또는 중합체 코팅에 함

침된다. 다른 구체예에서, CNP 변이체는 스텐트의 바디에 형성되어 다공질 중합체 막이나 층으로 덮인 저장소 또는 채널에 함유되며, 다공질 중합체 막이나 층을 통해 CNP 변이체가 확산될 수 있다. 중합체 매트릭스, 코팅, 막 또는 층은 본 분야에 공지된 대로 적어도 하나의 생분해성(예를 들어, 친수성) 중합체를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, CNP 변이체는 스텐트 바디의 미세공극들에 함유될 수 있다. CNP 변이체는 분출 방출, 맥동 방출, 제어 방출 또는 지속 방출 또는 이들의 조합에 의해 스텐트로부터 송달될 수 있다. 예를 들어, 스텐트는 처음에는 분출 방출되고, 이후 지속 방출되는 방식으로 질환 부위에 CNP 변이체를 국소 송달할 수 있다. 지속 방출은 최대 약 2주, 약 1개월, 2개월, 3개월, 6개월 또는 1년까지의 기간에 걸쳐서 이루어질 수 있다.

[0784] 당업자는 CNP 변이체가나 그 조성물이 다른 방식에 의해서도 투여될 수 있다는 것을 인정할 것이다. CNP 변이체가나 그 조성물의 가장 효과적인 투여 방식의 결정은 당업자의 기술 범위 내이다.

[0785] CNP 변이체는, 예를 들어 경구(협측 및 설하 경로를 포함), 직장, 코, 국소, 폐, 질 또는 비경구(근육내, 동맥내, 경막내, 피하 및 정맥내 경로를 포함) 투여에 적합한 제약 제제로서, 또는 흡인(inhalation) 또는 흡입(insufflation)에 의한 투여에 적합한 형태로서 투여될 수 있다. 의도된 투여 방식에 따라서, 제약 제제는 고체, 반고체 또는 액체 제형의 형태, 예를 들어 정제, 좌약, 알약, 캡슐, 분말, 액체, 현탁액, 에멀젼, 크림, 연고, 로션 등의 형태일 수 있다. 제제는 정확한 투약량의 1회 투여에 적합한 단위 제형으로 제공될 수 있다. 제제는 유효량의 CNP 변이체, 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제, 담체 및/또는 희석제, 및 선택적으로 하나 이상의 다른 생물학적 활성제를 포함한다.

[0786] **조합 치료법**

[0787] 한 구체예에서, CNP 변이체는, 예를 들어 뼈-관련 질병(예를 들어, 골격 이형성증) 및 혈관 평활근 질병과 같은 CNP-반응성 상태나 질병을 치료, 완화 또는 예방하는데 유용한 하나 이상의 다른 활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 다른 활성제(들)는 CNP 변이체의 효과를 증진시킬 수 있고, 및/또는 CNP 변이체의 효과에 더하여 다른 약물학적 효과를 발휘할 수 있다. 본원에 설명된 CNP 변이체과 조합하여 사용될 수 있는 활성제의 비제한적 예는 다른 나트륨이뇨 펩티드(예를 들어, BNP)와 펩티아제 및 프로테아제(예를 들어, NEP 및 푸린), NPR-C 및 티로신 키나제(예를 들어, FGFR-3)의 억제제(예를 들어, 길항제)이다. NEP 억제제는 CNP 변이체의 NEP에 의한 제거를 방지하여 CNP 변이체의 반감기를 연장할 수 있다. NEP 억제제의 예는, 제한은 아니지만 티오르판(thiorphan) 및 칸독사트릴(candoxatril)을 포함한다. 또한, NPR-C 억제제의 병용은 NPR-C에 의한 CNP 변이체의 제거를 억제하여 CNP 변이체의 반감기를 연장할 수 있다. NPR-C 억제제의 비제한적 예는 FGIPMDRIGRNPR(서열번호 82)의 단편으로서, 이것은 FGIPMDRIGRNPR-CNP22 키메라(유사체 CZ)(서열번호 82) 또는 CNP22의 변이체를 포함하는 유사 키메라(예를 들어, CNP22에 비해 아미노산 치환(들), 부가(들) 및/또는 결실(들)을 함유하는 것들)의 단백질 가수분해 절단시 표적 부위(예를 들어, 뼈 성장판)에서 방출된다. 티로신 키나제 억제제의 병용은 연골세포 및 뼈 성장의 역(negative) 조절제인 티로신 키나제 수용체 FGFR-3을 억제함으로써 CNP 치료법의 효과를 강화할 수 있다. 티로신 키나제 억제제의 비제한적 예는 미국특허 제6,329,375호 및 제6,344,459호에 개시된 것들을 포함한다.

[0788] 조합 치료법에서 적절한 치료 성과를 달성하기 위해, 일반적으로 CNP 조성물과 다른 치료제(들)는 원하는 치료 성과(예를 들어, 뼈 성장 회복)를 생산할 수 있는 총합 유효량으로 대상에게 투여된다. 이 과정은 CNP 조성물과 다른 치료제(들)를 동시에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 동시 투여는 CNP 변이체과 다른 치료제(들)를 모두 포함하는 단일 조성물이나 약물학적 단백질 제제를 투여함으로써 달성될 수 있다. 대안으로서, 다른 치료제(들)는 CNP 변이체의 약물학적 제제(예를 들어, 정제, 주사 또는 드링크)와 대략 동시에 따로따로 투여될 수 있다. 또한, CNP 변이체는 섭취에 적합한 브라우니, 팬케이크 또는 케이크와 같은 식품으로 제제화될 수 있다.

[0789] 다른 대안으로서, CNP 변이체의 투여는 수분 내지 수시간 범위의 간격으로 다른 치료제(들)의 투여에 앞서 또는 이후에 이루어질 수 있다. 다른 치료제(들)과 CNP 조성물이 분리되어 투여되는 구체예에서, CNP 변이체과 다른 치료제(들)은 일반적으로, CNP 변이체과 다른 치료제(들)이 환자에게 상승작용적으로 또는 추가적으로 유익한 효과를 발휘할 수 있도록 서로 적절한 시간 내에 투여되어야 한다. 예를 들어, 다른 치료제(들)의 투여 약 0.5~6시간 이내(이전 또는 이후)에 CNP 조성물을 투여할 수 있다. 한 구체예에서, CNP 조성물은 다른 치료제(들)의 투여 약 1시간 이내(이전 또는 이후)에 투여된다.

[0790] **환자군의 확인 및 모니터링**

[0791] CNP 치료법에 적합한 대상을 확인하고, 주어진 환자가 CNP 치료법에 반응하는지를 결정하기 위한 프로토콜이 확립될 수 있다. 예를 들어, 뼈-관련 질병의 치료를 위해서, 성장 징표가 측정될 수 있는데, 예를 들어 자궁내

시기와 신생아기의 장골 성장 측정, CNP, cGMP, II형 콜라겐, 오스테오칼신, 및 증식성 세포핵 항원(PCNA)와 같은 뼈 성장 생체마커의 측정이 그것이다.

[0792] 한 CNP 신호화 마커는 cGMP(구아노신 3',5' 환형 모노포스페이트)이다. 이 세포내 신호화 분자의 수준은 CNP 결합 후 증가하며, 그것의 동족 수용체인 NPR-B를 활성화한다. cGMP의 상승된 수준은 CNP 노출 후의 세포 배양 추출물(생체외)에서, CNP 노출 후의 뼈 외식 연구(생체외)의 컨디셔닝 배지에서, 그리고 피하, 정맥내, 또는 본 분야에 공지된 다른 투여 경로로 CNP를 투여하고 수분 이내에 혈장(생체내)에서 측정될 수 있다.

[0793] 또한, 연골 및 뼈-특이적 분석물질(또는 연골- 및 뼈-관련 마커)을 측정하여 CNP 효능을 평가할 수 있다. 예를 들어, 절단된 II형 콜라겐의 단편은 연골 턴오버의 연골-특이적 마커이다. II형 콜라겐은 연골의 중요한 유기 성분이고, 연골 턴오버 후에, II형 콜라겐의 단편(절단된 콜라겐)이 순환계로 방출되며, 이어서 소변으로 분비된다. 연골 턴오버는 새로운 뼈 형성에 선행하는 과정이다.

[0794] 측정될 수 있는 뼈 형성에 대한 뼈-특이적 생체마커는 I형 프로콜라겐의 N-말단 프로펩티드(PINP)이다. I형 콜라겐의 합성은 뼈 형성의 중요한 단계이며, I형 콜라겐은 뼈 바탕질의 중요한 유기 성분이다. 콜라겐 합성 동안, 프로펩티드가 프로콜라겐 분자로부터 방출되고, 혈청에서 검출될 수 있다. 또한, I형 콜라겐의 단편이 뼈 재흡수의 마커로서 측정될 수 있다.

[0795] 연골 및 뼈의 형성과 성장에 대한 다른 잠재적 생체마커는 아그레칸 콘트로인틴 술페이트(연골 턴오버의 연골-특이적 마커), II형 콜라겐의 프로펩티드(연골 형성의 연골-특이적 마커), 알칼리성 포스파타제(뼈-특이적) 및 오스테오칼신(뼈 형성의 뼈-특이적 마커)를 포함한다. 연골- 및 뼈-관련 생체마커는, 예를 들어 효능/약동태학 생체내 연구로부터의 혈청에서, 그리고 생체외 연구의 컨니셔닝 배지로부터, 상업적으로 입수가능한 키트를 이용하여 측정될 수 있다.

[0796] 한 구체예에서, 생체내에서 뼈와 연골의 형성 및 성장에 대한 CNP 변이체의 효과를 모니터하기 위해서 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 생체마커의 수준이 CNP 변이체가 투여된 대상에서 분석되거나 측정된다. 예를 들어, 적어도 하나의 뼈- 또는 연골-관련 생체마커의 수준의 증가는 CNP 변이체의 투여가 뼈 성장에 긍정적인 효과를 가지며, 골격 이형성증 및 감소된 CNP 활성과 관련된 다른 뼈- 또는 연골-관련 질환 또는 질병의 유용한 치료제임을 암시할 수 있다. 뼈- 또는 연골-관련 생체마커의 예는, 제한은 아니지만 CNP(예를 들어, 내인성 CNP의 수준), cGMP, II형 콜라겐의 프로펩티드 및 그것의 단편, II형 콜라겐 및 그것의 단편, 오스테오칼신, 증식성 세포핵 항원(PCNA), I형 프로콜라겐의 프로펩티드(PINP) 및 그것의 단편, I형 콜라겐 및 그것의 단편, 아그레칸 콘드로이틴 술페이트 및 알칼리성 포스파타제를 포함한다.

[0797] 한 구체예에서, 생체마커는 CNP 변이체가 투여될 예정인, 투여 중인, 또는 투여된 적이 있는 대상로부터 생물학적 샘플을 얻어서 측정한다. 생체마커는 본 분야에 공지된 기술을 사용하여 측정될 수 있으며, 이들은 제한은 아니지만 웨스턴 블롯, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 및 효소 활성 분석을 포함한다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 소변, 또는 다른 생물학적 유체일 수 있다.

[0798] 본 발명의 추가의 양태 및 상세한 내용은 이후의 실시예로부터 명확해질 것이며, 실시예들은 제한이 아니라 예시를 위한 것이다.

[0799] [실시예 1]

[0800] CNP 변이체의 합성

[0801] 본원에 설명된 방법들을 사용해서 CNP 변이체들을 제조했다. 표 1-3(실시예 3에서 제시된다)에 나타낸 대로, CNP22의 야생형 서열의 각 아미노산 잔기들을 천연 또는 비천연 아미노산으로 치환하거나 또는 펩티드유사체(peptidomimetics)로 만들었다. 특정 변이체들에서는 추가의 아미노산이 야생형 CNP22 서열의 전체 또는 일부분에서 N-말단 및/또는 C-말단 단부에 부가되었다(표 3 참조).

[0802] 또한, PEG(또는 PEO) 부분이 CNP22 또는 그것의 변이체의 N-말단에 콘쥬게이트된 CNP 변이체들을 제조했다(표 4 참조, 실시예 3에서 제시된다). PEG화 시약은 표 5에 나타낸 상업적 공급원으로부터 얻을 수 있다.

표 5

[0803]

판매자	상품명	명칭	MW (Da)	PEG 화 시약
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	(Methyl-PEG12)3-PEG4-NHS 에스테르	(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	메틸 PEG24-NHS 에스테르	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	메틸 PEG12-NHS 에스테르	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	모노(락토실아미도) 모노(숙신이미딜)키질	LSS	590	
Pierce	EZ-link NHS-LC-LC-Biotin	LC-LC-Biotin	570	
Pierce	EZ-link NHS-LC-Biotin	LC-Biotin (LC = 장쇄)	450	
Pierce	EZ-link NHS-Biotin	Biotin	340	

[0804] Pierce Biotechnology(일리노이 록포드)에서 구입한 PEG(PEO라고도 한다) 폴리머는 단분산성이며, 이들은 특정 분자량을 가진 분리되는 단일 폴리머를 함유한다. 반면에, NOF(Nippon Oil and Fat)에서 구입한 PEG 폴리머는 다분산성이며, 이들은 어떤 분자량 분포를 갖는 폴리머들의 혼합물을 함유한다.

[0805] CNP22나 그것의 변이체들의 PEG화를 위해 반응 및 정제 조건은 각 PEG-CNP 콘쥬게이트에 최적화된다. 일반적인 PEG화 과정에 따라서, 반응 혼합물은 칼륨 포스페이스 버퍼 중에 약 1mM의 CNP22 또는 그것의 변이체과 약 1~5mM의 NHS-활성화 PEG를 함유하며, pH는 약 5.0~6.5이다. 펩티드 N-말단에서 선택적으로 단일-PEG화되도록 하고 내부 부위(예를 들어, CNP22의 Lys4)에서의 PEG화는 최소화하기 위해, PEG화 반응을 더 산성인 조건(예를 들어, 약 5.5~6.5의 pH)에서 수행하여, 리신 측쇄 상의 더 염기성인 1차 아미노기를 선택적으로 양성자화해서 비활성화시킬 수 있다. 실온에서 약 1~3시간 인큐베이션한 후에, PEG화 반응물에 수성 글리신 버퍼를 가하여 퀀칭한다. 다음에, 반응 산물을 각 PEG-CNP 콘쥬게이트에 대해 최적화된 역상 HPLC에 의해 분리한다. 분획 샘플들을 급속 건조시키고, 1mM HCl에서 복원/제제화한다. 액체 크로마토그래피-질량분광기(LC/MS)로 각 PEG-CNP 산물을 확인하고, 순도를 결정한다.

[0806] [실시예 2a]

[0807] 재조합에 의한 CNP 변이체들의 생산

[0808] 재조합 기술에 의해서 CNP 변이체들을 생산할 수 있다. 특정 구체예에서, CNP 변이체들을 절단가능한 펩티드, 담체 단백질 또는 꼬리표를 포함하는 융합 단백질로서 생산한다. 재조합에 의해 CNP 융합 단백질을 생산하는 예시적인 방법들을 하기 개시한다.

[0809] 재료 및 방법

[0810] 발현 백터에 CNP 융합 단백질의 클로닝

[0811] CNP DNA 단편들을 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭시키고, 증폭된 PCR 단편들을 NdeI와 BamHi로 효소절단해서

pET21a 벡터(Novagen, 뉴저지 깁스타운)에 클로닝했다. CNP 융합 단백질 DNA를 DNA2.0에 의해 합성하고, 상이한 발현 벡터들(표 6)에 클로닝했다.

표 6

구성물	벡터	산물	화학적 절단	최종 산물	발현 *E. coli* 균주
pJexpress-TAF-CNP	pJexpress401	TAF-CNP 봉입체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21; BL21(DE3)
pJexpress-KSI-CNP(M/N)	pJexpress404	KSI-CNP(M/N) 봉입체	CNBr (Met-X)	CNP(M/N)	BL21
pET-31b-KSI-CNP	pET-31b	KSI-CNP 봉입체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)
pET-32a-Trx-CNP	pET-32a	Trx-CNP 융합 단백질(가용성)	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)
pMAL-CNP	pMAL-c2X	MBP-CNP 융합 단백질(가용성)	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP	BL21(DE3)

CNP: GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Gly-CNP37 (SEQ ID NO: 75); **TAF**: 사람 전사인자 TAF12; **KSI**: 케토스테로이드 이소머라제; **MBP**: 말토스-결합 단백질; **Trx**: 티오레독신

[0812]

[0813] *E. coli*에서 CNP 융합 단백질의 발현

[0814] CNP 융합 단백질 발현 플라스미드로 *E. coli* BL21 또는 BL21(DE3)을 형질전환했다. 형질전환된 세포를 100ug/mL 카르베니실린 또는 50ug/mL 카나마이신을 함유하는 LB 플레이트에 평판하고 37℃에서 하룻밤 인큐베이션했다. 1개의 단일 콜로니를 선택해서 37℃에서 100ug/mL 카르베니실린 또는 50ug/mL 카나마이신을 함유하는 4mL LB 배지 중에서 교반하면서 배양했다. 박테리아 배양물의 OD_{600}이 0.6에 도달했을 때, 1mM의 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 세포 배지에 가하고, 배지를 37℃에서 3시간 동안 교반하면서 인큐베이션했다. 세포 수거를 위해, 박테리아 세포를 10분 동안 4000rpm에서 원심분리하고, 세포 펠릿을 -80℃에서 저장했다. 세포 펠릿을 실온에서 10분 동안 B-PER II 박테리아 추출 시약(PIERCE, 박테리아 배양물 4mL 당 0.4mL)과 Benzonase 뉴클레아제(Novagen, 0.025U/mL)로 세포를 용해했다. 박테리아 조 추출물을 조금 남겨두고 원심분리해서 상청액을 얻었다. 상청액과 조 추출물을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해서 CNP 융합 단백질 발현 및 용해도에 대해 분석했다.

[0815] SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의한 CNP 융합 단백질 발현의 검출

[0816] 세포 용해물 또는 가용성 상청액 10uL를 나트륨 도데실 술페이트-폴리아크릴이미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)(Invitrogen, 캘리포니아 칼스배드, NuPAGE 4~12% 비스-트리스 겔, MES SDS 버퍼) 상에서 전개시켰다. 겔을 실온에서 1시간 동안 20mL Imperial 단백질 염료(Thermo Fisher, 일리노이 록포드)로 염색하고, 물로 탈염했다. 웨스턴 블롯의 경우, 단백질을 Gel 블롯(Invitrogen)을 가진 막으로 옮겨 놓았다. 막을 실온에서 1시간 동안 5% 밀크를 넣은 TBS 버퍼 중에서 차단했다. 토끼 항-CNP22 항체(1:2500 희석)(Bachem, 캘리포니아 토랜스)를 막에 가한 다음, 실온에서 2시간 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 막을 TBS 버퍼로 3번 세척했다.

[0817] 알칼리성 포스페이트(AP)에 콘쥬게이트된 항-토끼 IgG(1:5000 희석)를 막에 가한 다음, 실온에서 1시간 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 막을 TBS 버퍼로 3번 세척했다. WESTERN BLUE 안정화 기질(Promega, 위스콘신 메디슨) 10mL를 막에 가한 다음, 실온에서 1~5분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 막을 TBS 버퍼로 세척해서 과량의 염료를 제거했다.

[0818] *E. coli BL21*에서 TAF-CNP 융합 단백질의 발현

[0819] TAF-CNP 융합 단백질을 발현하는 세포(*E. coli* 균주 BL21)를 -80℃에 저장된 글리세롤 스톡으로부터 얻어서 37

℃에서 50ug/mL 카나마이신을 함유하는 4mL LB 배지 중에서 교반하면서(250rpm) 하룻밤 성장시켰다. 하룻밤 성장시킨 세포 배양물 4mL를 50ug/mL 카나마이신을 함유하는 200mL LB 배지로 옮겨서 37℃에서 교반하면서(250rpm) 성장시켰다. OD_{600}이 0.6에 도달했을 때, IPTG를 최종 농도 1mM로 가하고, 37℃에서 3시간 동안 교반하여(250rpm) 단백질의 발현을 유도했다. 다음에, 세포를 10분 동안 3000rpm에서 원심분리하고, 결과의 세포 펠릿을 -80℃에서 냉동시켰다.

[0820] TAF-CNP 봉입체의 정제 및 포름산 절단

[0821] 세포 펠릿(200mL 배양물로부터 얻은)을 25mL의 B-PER II 버퍼(PIERCE)에 재현탁하고, 얼음 위에서 10분 동안 초음파 처리하고(50%, 1초, 중지 2초), 4℃에서 20분 동안 12000rpm에서 원심분리한 다음, 펠릿을 25mL의 20x 희석된 B-PER II 버퍼에 재현탁했다. 이것을 상청액이 투명하게 될 때까지 반복했다(3~5회). 재현탁된 TAF-CNP 봉입체 1mL를 1.5mL 튜브로 옮겨서 15분 동안 14000rpm에서 원심분리했다. 상청액을 버리고, 펠릿을 88% 포름산 10uL로 용해한 다음, Millipore로 여과된 물 490uL를 즉시 가했다. 펠릿을 와동장치에서 잘 혼합한 후, 55℃에서 20~24시간 동안 인큐베이션했다(대안적 조건은 70℃/6시간). 포름산 절단 산물을 SDS-PAGE 및 LC/MS(C4RP)에 의해 분석했다.

[0822] LC/MS 샘플 제조

[0823] 약 8mL의 배양물(약 1.5 OD)로부터 봉입체를 분리해서 펠릿을 10uL nt 포르메이트에 용해했다. 재용해된 펠릿을 2% 또는 10% 최종 포르메이트 농도(0.5mL)까지 즉시 희석하고, 55℃에서 21시간 동안 인큐베이션했다(pH 2)(다음날 2% 포르메이트 샘플에서 흐릿함이 더 분명했다). 두 샘플을 모두 15000rpm에서 2분 동안 원심분리했다. 상청액 12uL를 LC/MS(C4RP) 장치에 주입했다.

[0824] 결과

[0825] CNP 융합 단백질이 *E. coli*에서 발현되었다

[0826] 모든 CNP 융합 단백질이 37℃에서 3시간 동안 1mM IPTG 유도된 *E. coli*에서 발현되었다(도 1). pJexpress-TAF-CNP, pJexpress-KSI-CNP(M/N) 및 pET-31b-KSI-CNP 구성물은 봉입체로서 발현되었고, pET-32a-Trx-CNP 및 pMAL-CNP 구성물은 가용성 융합 단백질로서 발현되었다. 항-CNP22 항체를 이용한 웨스턴 블롯으로 CNP 융합 단백질의 발현을 확인했다(도 1).

[0827] CNP가 포름산 절단에 의해서 TAF-CNP 봉입체로부터 생산되었다

[0828] TAF-CNP 봉입체를 부분적으로 정제하고, 55℃에서 20~24시간 동안 2% 포름산으로 처리했다(대안적 조건은 70℃/6시간). TAF-CNP의 대부분이 절단되었고, Gly-CNP37과 유사한 크기를 가진 1개의 가외의 밴드가 SDS-PAGE 상에 나타났다(도 2). 절단된 샘플을 LC/MS(C4RP)로 더 분석했다. LC/MS 결과는 포름산 절단 후 TAF-CNP 봉입체로부터 CNP가 가용성 형태로 방출되었음을 나타냈다. LC/MS 분석은 CNP 융합 단백질의 포름산 절단이 고리화된 Pro-Gly-CNP37(MW=4102)를 형성했음을 시사했다. 분석에 기초한 단백질 양의 계산은 OD가 매우 낮은 배양물 8mL로부터 포름산-생성된 CNP가 약 60ug 생산되었음을 시사했다. OD가 낮은 세포 배양물(예를 들어, 1.2 OD)을 소량(예를 들어, 약 8mL)으로 사용하여 약 8ug/mL의 CNP가 생산되었고, OD가 높은 세포 배양물(예를 들어, 38 OD)을 대량(예를 들어, 약 8L)으로 발효시켜면 약 1mg/mL의 CNP를 생산할 수 있다.

[0829] 결론

[0830] CNP 융합 단백질을 발현할 수 있는 5개의 발현 구성물이 생성되었다. 5개의 구성물의 발현은 모두 가용성(Trx 및 MBP) 또는 불용성(TAF 및 KSI) CNP 융합 단백질을 생산했다. 간단한 포름산 절단 과정에 의해 TAF-CNP 봉입체로부터 약 1mg/mL의 가용성 CNP가 생산될 수 있다.

[0831] [실시예 2b]

[0832] *E. coli*에서 추가의 CNP 변이체들의 생산

[0833] 재조합에 의한 CNP 변이체들의 생산을 실시예 2A에 설명된 대로 수행했다. 이 실시예에서, 추가의 CNP 구성물들은 QuikChange II XL 부위-지정 돌연변이유발 키트(Stratagene)를 사용하여 생성되거나, 또는 DNA2.0에 의해 합성되었다. 추가의 CNP 구성물들과 발현 벡터들이 표 7에 제시된다.

표 7

구성물	벡터	산물	화학적 절단	최종 산물	발현 *E. coli* 균주
pJexpress-TAF(C/A)-Pro-CNP38	pJexpress401	TAF(C/A)-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21(DE3)
pJexpress-TAF(4D/4E)-Pro-CNP38	pJexpress401	TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21(DE3)
pJexpress-TAF (C/A&4D/4E)-Pro-CNP38	pJexpress401	TAF(C/A&4D/4E)-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21(DE3)
pJexpress-TAF (C/A&10D/10E)-Pro-CNP38	pJexpress401	TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21(DE3)
pJexpress-TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38	pJexpress401	TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21(DE3)
pJexpress-BMP-Pro-CNP38	pJexpress401	BMP-Pro-CNP38 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP38	BL21; BL21(DE3)
pJexpress-TAF-Pro-CNP37	pJexpress401	TAF-Pro-CNP37 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP37	BL21; BL21(DE3)
pJexpress-BMP-Pro-CNP37	pJexpress401	BMP-Pro-CNP37 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP37	BL21; BL21(DE3)
pJexpress-TAF-Pro-HSA-CNP	pJexpress401	TAF-Pro-HSA-CNP 융합체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-HSA-CNP	BL21
pJexpress-TAF	pJexpress401	TAF 융합체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-BMP	pJexpress401	BMP 융합체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-TAF(C/A)	pJexpress401	TAF(C/A) 융합체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-TAF(4D/4E)	pJexpress401	TAF(4D/4E) 융합체	N/A	N/A	BL21(DE3)

[0834]

pJexpress-TAF (C/A&4D/4E)	pJexpress401	TAF(C/A&4D/4E) 봉입체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-TAF (C/A&10D/10E)	pJexpress401	TAF(C/A&10D/10E) 봉입체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-TAF-NL-(C/A & 6D/6E)	pJexpress401	TAF-NL-(C/A&6D/6E) 봉입체	N/A	N/A	BL21(DE3)
pJexpress-TAF-Pro-CNP53	pJexpress401	TAF-Pro-CNP53 봉입체	포름산 (Asp-Pro)	Pro-CNP53	BL21(DE3)
pJexpress-TAF-CNP34	pJexpress401	TAF-CNP34 봉입체	포름산 (Asp-Pro)	CNP34	BL21(DE3)

CNP38: GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Gly-CNP37 (SEQ ID NO: 75)];

Pro-CNP38: PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC [Pro-Gly-CNP37] (SEQ ID NO: 145);

CNP37: QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 60);

HSA-CNP: GHKSEVAHRFKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC [HSA-CNP27 (SEQ ID NO: 144)];

Pro-CNP53: PDLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIG-SMSGLGC (SEQ ID NO: 185);

CNP34: PNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 163);

TAF-Pro-CNP38: MVLTKKKLQDLVREVCPNEQLDEDVEEMLLQIADDFIESVVTAA-CQLARHRKSSTLEVKDVQLHLERQWNMWIMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHT-GDDDDKHMDPGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (SEQ ID NO: 196);

TAF: 사람 전사인자 TAF12 히스티딘 접힘 도메인(HFD) 및 pET-15b 벡터 유래 링커;

TAF-NL: TAF12 HFD, 링커 없음;

TAF12 HFD: VLTKKKLQDLVREVCPNEQLDEDVEEMLLQIADDFIESVVTAACQLA-RHRKSSTLEVKDVQLHLERQWNMWI (SEQ ID NO: 197);

pET-15b 링커: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHTGDDDDKHMD (SEQ ID NO: 195);

TAF(C/A): TAF의 시스테인이 알라닌으로 치환된다;

TAF(D/E): TAF의 아스파르트산이 글루탐산으로 치환된다(숫자는 아미노산 잔기가 치환된 수를 표시한다);

TAF(C/A & D/E): TAF의 시스테인과 아스파르트산이 알라닌과 글루탐산으로 각각 치환된다;

BMP: 7 개의 C/A(시스테인에서 알라닌으로) 돌연변이를 가진 뼈 형태발생 단백질 2;

KSI: 케토스테로이드 이소머라제; **MBP**: 말토스-결합 단백질; **TRX**: 티오레독신

[0835]

[0836] 결과

[0837] 모든 CNP 융합 단백질들이 37℃에서 3시간 동안 1mM IPTG 유도된 *E. coli*에서 발현되었다. pJexpress-BMP-Pro-CNP38, pJexpress-TAF-Pro-CNP37, pJexpress-BMP-Pro-CNP37, pJexpress-Pro-HSA-CNP, pJexpress-TAF 및 pJexpress-BMP 구성물은 봉입체로서 발현되었다. 항-CNP 항체를 사용한 웨스턴 블롯으로 발현이 확인되었다(도 3).

[0838] Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")이 포름산 절단에 의해서 TAF-Pro-CNP38 봉입체로부터 생산되었다

[0839] 포름산은 봉입체 단백질의 변성제로서 사용되며, 최적 조건에서 이 펩티드를 Asp와 Pro 사이에서 특이적 절단할 수 있다. TAF-Pro-CNP 봉입체를 상기 설명된 대로 부분 정제하고, 25℃, 37℃, 42℃ 및 55℃에서 24시간 동안 50% 포름산으로 처리했다. 대부분의 TAF-Pro-CNP38이 절단되었고, Cly-CNP37("CNP38") 펩티드와 유사한 크기를 가진 1개의 가외의 밴드가 37℃, 42℃ 및 55℃ 절단에서 SDS-PAGE 상에 나타났다(도 4a). 37℃와 55℃에서 수행된 절단 반응에서는 10M NaOH로 중화하고, 15분 동안 14,000rpm에서 원심분리했다. 미절단된 TAF-Pro-CNP38, TAF 및 다른 봉입체들이 펠릿에 침전했다. 상청액은 가용성 Pro-CNP38을 함유했으며, LC/MS로 더 분석

했다. LC/MS 결과는 상청액이 과잉의 산성 가수분해에 의해 생성된 비특이적 절단된 펩티드들의 혼합물을 함유했음을 나타냈다.

[0840] TAF-Pro-CNP 봉입체를 55℃에서 20시간 동안 2% 및 10% 포름산으로 처리했을 때, 대부분의 TAF-Pro-CNP38이 절단되었고, Cly-CNP37과 유사한 크기를 가진 1개의 가외의 밴드가 SDS-PAGE 상에서 관찰되었다(도 4b). 절단된 샘플을 LC/MS로 더 분석했다. LC/MS 분석은 포름산 절단 후에 TAF-Pro-CNP38 봉입체로부터 정확한 Pro-CNP38이 가용성 형태로 방출되었음을 나타냈다. 2% 및 10% 포름산 절단에서 Pro-CNP38의 수율은 유사했다(도 4c).

[0841] Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 생산 및 정제를 위한 포름산 절단 및 중화

[0842] 포름산은 TAF-Pro-CNP38, BMP-Pro-CNP38 및 다른 봉입체를 용해하여 절단할 수 있다. pH 중화에 의해서 불용성 오염 단백질/펩티드(미절단된 TAF-Pro-CNP38 및 BMP-Pro-CNP38, TAF, BMP 및 기타)가 침전된다. 원심분리 후 상청액 중에는 가용성 Pro-CNP38이 남는다. TAF-Pro-CNP38 및 BMP-Pro-CNP38을 55℃ 또는 70℃에서 24시간 동안 2% 포름산 중에서 절단했다. 절단 반응을 0.5M 트리스 버퍼를 1:1의 비율로 사용하여 중화하고, 15분 동안 14,000rpm에서 원심분리했다. 결과는 상청액이 거의 순수한 펩티드를 함유했으며, 중화시 Pro-CNP38의 회수 손실은 관찰되지 않은 것으로 나타났다. 이것은 Pro-CNP38 정제를 위한 간단하며 효과적인 단계이다.

[0843] Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 생산을 위한 TAF-Pro-CNP38 봉입체의 포름산 절단 조건을 다변화한 분석

[0844] 포름산은 최적 조건에서 펩티드를 Asp와 Pro 사이에서 특이적으로 절단할 수 있다. 포름산 절단 조건이 최적화되지 않을 경우 Asp와 다른 아미노산 사이의 펩티드 결합의 비특이적 절단이나, 또는 심지어 어떤 펩티드 결합의 비특이적 절단이 일어날 수 있다. TAF-Pro-CNP38 봉입체를 42℃, 55℃ 또는 70℃에서 6, 24 또는 48시간 동안 2% 포름산으로 절단했다. 도 5a는 74℃ 24시간 조건 또는 55℃ 48시간 조건에서 TAF-Pro-CNP38이 완전히 절단되었음을 나타낸다. 70℃ 절단은 17시간 이내에 완료될 수 있었다(도 5b). 70℃/24h 절단에서 최고 수율이 얻어졌지만, 비특이적 절단 산물(예를 들어, Asp와 Arg 사이의 펩티드 결합 절단으로 인해 Pro-CNP38로부터 생성된 분자량 3142의 펩티드)이 비약적으로 증가하였다(도 5c).

[0845] Pro-CNP38의 수율과 순도는 TAF-Pro-CNP38 봉입체가 포름산 절단 전에 B-PER II 버퍼로 정제되거나 처리되었을 때 개선되었다. B-PER II 버퍼는 세제인 옥틸티오글루코시드를 함유하고 비교적 고가이기 때문에, 다른 일반적으로 사용되는 세제나 버퍼들을 대규모 Pro-CNP38 생산을 위해서 시험했다. TAF-Pro-CNP38 봉입체를 상이한 세제들(옥틸수크로오스; Triton x-100; Tween-20; NP-40; CA-630) 또는 버퍼들(B-PER II; B-PER II 1/20 희석; B-PER; B-PER 포스페이트 버퍼; 25mM 트리스, 150mM NaCl, pH 7.9; 25mM 트리스, pH 7.5; 여과수; PBS)에 재현탁하고, 실온(RT)에서 24시간 동안 인큐베이션했다. 모든 세제는 25mM 트리스 버퍼의 1% 용액이었고, pH 7.5이다. 세제 또는 버퍼 중에서 인큐베이션한 후, TAF-Pro-CNP38 봉입체를 55℃에서 22시간 동안 2% 포름산으로 절단했다. 결과는 BPERII가 계속 양호한 수율을 나타냈음을 보였으며, CA630 및 Triton X-100에서도 양성 결과가 얻어졌다.

[0846] Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 단백질 가수분해 절단 산물

[0847] 막 결합 프로테아제일 1개의 미확인된 프로테아제가 Pro-CNP38 펩티드(BL21 균주에서 생산, MW 4102)를 Pro-CNP38 정제 동안 2개의 펩티드로 절단하여 펩티드 PGQEHPNAR(MW 1004)(서열번호 198)와 KYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (MW 3115)(서열번호 199)가 생겼다. 세제가 Pro-CNP38의 수율과 순도를 개선할 수 있는 한 가지 가능한 이유는 세제가 미확인된 프로테아제를 전부는 아니지만 대부분을 제거할 수 있기 때문이다. 이들 제제가 프로테아제 절단을 억제할 수 있는지 확인하기 위해서 고온, 염기성 pH 및 EDTA를 시험했다. TAF-Pro-CNP38 봉입체를 실온 또는 120℃에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 15분 동안 14000rpm에서 원심분리했다. 펠릿을 2% 포름산에 재현탁하고, 55℃ 또는 70℃에서 18시간 동안 인큐베이션했다. 0.5M 트리스를 1:1의 비율로 가하여 절단을 중화했다. 중화된 샘플을 5분 동안 14000rpm에서 원심분리하고, 상청액을 10mM EDTA pH 10을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우로 하여 실온에서 6시간 또는 22시간 방치했다. 단백질 가수분해 절단을 LC/MS로 분석했다(표 8).

표 8

Pro-CNP38 단백질 가수분해 절단의 LC/MS 결과

샘플		A210 피크 영역	단백질 농도 (mg/mL)		퍼센트 MW4102	퍼센트 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

[0848]

[0849] 70℃에서 절단된 모든 샘플(8~12)은 제한된 단백질 가수분해 절단을 나타냈다(Pro-CNP38 절단의 4% 미만). Pro-CNP38의 거의 40%는 절단이 55℃에서 수행되었을 때 프로테아제에 의해서 절단되었다(샘플 7). 염기성 pH 및 EDTA는 비특이적 단백질 가수분해 절단에 영향을 미치지 않았다. 고온(120℃, 2시간)은 Pro-CNP38을 비특이적으로 절단했다.

[0850] Stratagene로부터의 BL21(DE3) 균주는 미확인된 프로테아제를 갖지 않는다는 점이 주지되어야 한다.

[0851] 상이한 구성물로부터 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38") 및 다른 CNP 변이체들의 생산

[0852] 봉입체인 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질의 과발현과 이어진 융합 단백질의 포름산 절단에 의해서 Pro-CNP38이 *E. coli*에서 대규모로 생산될 수 있다. 본원에 설명된 방법에 따라서, 다른 TAF-CNP 융합 단백질들(TAF-CNP34 및 TAF-Pro-CNP53)도 봉입체로서 발현된 다음, 포름산으로 절단되어 CNP 변이체들인 CNP34 및 Pro-CNP53이 생성되었다. 도 6은 TAF-CNP34의 발현을 나타내고, 도 7은 TAF-Pro-CNP53의 발현을 나타내고, 도 8은 TAF-CNP34 및 TAF-Pro-CNP53의 포름산 절단 산물을 나타내고, 도 9는 LC/MS 크로마토그램에서 CNP-34의 피크를 나타내고, 도 10은 LC/MS 마이크로그램에서 Pro-CNP53의 피크를 나타낸다.

[0853] 포름산의 사용은 표적 Asp-Pro 결합 이외의 다른 펩티드 결합(들)에서 비특이적 절단(들)을 가져올 수 있다. 원하는 포름산 절단 산물의 순도 및 전체 역가를 개선하기 위해서, TAF12 및 그것의 단편들에서 아스파르트산의 상이한 잔기들을 글루탐산으로 치환했다. 또한, TAF12 또는 그것의 단편들에서 하나 이상의 시스테인 잔기들을 알라닌으로 치환함으로써 비특이적 이황화 결합의 형성을 방지했다. TAF12에 이러한 돌연변이를 가진 모든 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질은 봉입체로서 발현되었고, 포름산으로 절단하여 Pro-CNP38을 생산했다. 도 7은 TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 및 TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38의 발현을 나타내고, 도 11은 TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38 및 TAF(4D/4E)-Pro-CNP38의 발현을 나타내고, 도 12는 TAF(4D/4E)-Pro-CNP38 및 TAF(C/A & 4D/4E)-Pro-CNP38의 포름산 절단 산물을 나타내고, 도 13은 TAF-NL-(C/A & 6D/6E)-Pro-CNP38 및 TAF(C/A & 10D/10E)-Pro-CNP38의 포름산 절단 산물을 나타낸다. 표 9에 다양한 TAF-Pro-CNP38 구성물로부터 얻어진 Pro-CNP38의 순도(정제 전)와 역가가 요약된다.

표 9

구성물	순도	역가 (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

* pJexpress-TAF(C/A&10D/10E)-Pro-CNP38 를 가진 세포는 더 느리게 성장했고, 최종 세포 밀도(OD_{600})는 다른 TAF-Pro-CNP38 구성물들에 비해서 더 낮았다.

[0854]

[0855] 발효 및 포름산 절단에 의한 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")의 대규모 생산

[0856] pJexpress-TAF-CNP 구성물을 포함하는 BL21(DE3) 세포를 OD_{600}이 64에 도달할 때까지 37℃에서 약 16~17시간 동안 10리터 발효장치에서 성장시켰다. 다음에, 세포를 약 35~37℃에서 1mM IPTG의 존재하에 OD_{600}이 160에 도달할 때까지 약 7~8시간 동안 성장/배양하여 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질의 발현을 유도했다. 발효에 의해서 9g/L의 TAF-Pro-CNP38의 역가가 생산되었다. 도 14는 발효에 의해 생산된 TFA-Pro-CNP38 융합 단백질의 웨스턴 블롯을 나타낸다.

[0857] 10L 발효의 750mL 세포 배양물로부터 회수된 세포 펠릿을 pH 7.4의 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 재현탁하고, 압력 균질화기(10,000 bar)를 3회 통과시켜 세포를 용해했다. 결과의 세포 용해물을 10분 동안 6,500g에서 원심분리하여 상청액을 버렸다. 불용성 TAF-Pro-CNP38 융합 단백질 봉입체를 함유하는 펠릿 분획을 회전고정자(rotostator)에서 500mL의 PBS에 재현탁했다. 현탁액을 10분 동안 6,500g에서 원심분리하여 상청액을 버렸다. 결과의 봉입체 펠릿을 회전고정자에서 500mL의 물에 재현탁하고, 55℃에서 30분 동안 인큐베이션했다. 가온된 봉입체 현탁액에 250mL 6% 포름산을 2% 포름산의 최종 농도가 되도록 가한 다음, 55℃에서 20~24시간 동안 인큐베이션했다. 20~24시간 후에 400mL Na_2HPO_4를 50mL를 가해서 포름산 절단 반응의 중화를 시작하고, 결과의 혼합물을 50% w/v NaOH로 pH 6.9~7.4까지 적정한 다음, 실온에서 30분 방치했다. 중화시 무거운 침전물이 형성되었는데, 이것을 10분 동안 6,500g에서 원심분리하여 제거했다. 상청액을 보존했으며, 상청액은 80% 순수한 Pro-CNP38을 배양물 L당 평균 1.3g 함유했다. *E. coli* 및 TAF-관련 단백질과 펩티드는 대부분 펠릿에 남아 있었다.

[0858] 포름산 절단 및 중화된 상청액으로부터 얻어진 가용성 Pro-CNP38은 80%의 순도를 가졌으며, 다른 산물-관련 불순물들과 함께 선형 및 고리화된 Pro-CNP38 펩티드들의 혼합물을 함유했다. Pro-CNP38을 함유하는 pH가 중성인 상청액을 멸균여과했다. Fractogel TMAE Hi-CAP 칼럼(EMD Biosciences)을 사용한 음이온-교환 크로마토그래피로 더 정제하여 칼럼에 결합되는 DNA, 엔도톡신 및 펩티드 오염물들을 제거했으며, 이것은 pH 7~7.4에서 수행되었다. 통과된 분획은 부분적으로 고리화된 Pro-CNP38을 함유했다. 통과된 분획에 황산구리를 최종 농도 10uM로 가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 중성 pH에 Cu++의 첨가는 펩티드 상의 자유 시스테인 술프히드릴기의 산화를 촉매하며, 이로써 분자내 이황화 결합이 형성되어 100% 고리화된 Pro-CNP38이 얻어지고, 선형 펩티드는 검출되지 않는다. 용액의 전도도를 물을 첨가해서 15 mS/cm 미만으로 조정했다. 다음에, SP-Sepharose 칼럼(GE Healthcare)과 나트륨 포스페이트 버퍼(pH 7)을 사용한 양이온-교환 크로마토그래피를 수행하여 통과된 분획 중의 잔류 DNA와 엔도톡신을 제거함으로써, 비-산물-관련 불순물이 0.5% 미만인 약 95~96%의 순도까지 Pro-CNP38을 더 정제했다. 도 15는 SP-Sepharose 칼럼에서 나온 용출 분획들의 SDS-PAGE이다. Prop-CNP38의 최고 농도는 22~30번째 분획에서 발견되었다. 다 모이지 않은 24번째 분획의 역상 HPLC/MS 분석은 90% Pro-CNP38, 산화된 메티오닌 잔기를 가진 5% Pro-CNP38, Gly-Cys에서 절단되어 CNP-17을 형성한 3% Pro-CNP38 및 고리형 도메인에서 Asp-Arg 결합에서 절단된 1.6% Pro-CNP38의 존재를 시사했다. 최종 정제시 순수한 Pro-CNP38의 수율은 세포 배양물 L당 0.9g이었다(총 회수율 36%).

[0859] 5번의 개별 정제로부터 수집된 Pro-CNP38을 모아서 제제화했다. 모집된 산물은 93.5% Pro-CNP38, 산화된 메티오닌 잔기를 가진 3.3% Pro-CNP38, 탈아미드화된 1.3% Pro-CNP38 및 Gly-Cys에서 절단되어 CNP-17을 형성한 1%

Pro-CNP38을 함유했다. 샘플을 10 mS/cm의 전도도까지 50mM 나트륨 포스페이트(pH 7)로 희석하고, CM-Sepharose 칼럼(GE-Healthcare)에 로딩하여 농축과 버퍼 교환을 수행했다. CM-Sepharose 수지의 약한 양이온-교환 특성에 의해서 펩티드들을 전형적인 염 구배보다는 약산 용액에 의해서 칼럼으로부터 해리될 수 있다. CM-Sepharose 칼럼으로부터 Pro-CNP38의 해리에 필요한 산 농도는 칼럼 로딩량에 좌우되었다. 수지 mL당 50mg Pro-CNP38에서 10mM HCl은 Pro-CNP38 용출에 충분했다. 수지 mL당 9mg Pro-CNP38에서는 50mM HCl이 용출에 필요했다. 로딩량이 수지 mL당 9mg Pro-CNP38이었을 때, Pro-CNP38은 1 칼럼 부피 미만으로 용출되었고, 이것은 펩티드가 상당히 농축된 것이다. 용출 분획은 20.3mg/mL의 95% 순수한 Pro-CNP38과 함께 산화된 메티오닌 잔기를 가진 3% Pro-CNP38, 탈아미드화된 1% Pro-CNP38 및 Gly-Cys에서 절단되어 CNP-17을 형성한 1% 미만의 Pro-CNP38를 함유했다. 약산 중의 Pro-CNP38의 농축된 용액은 적합한 버퍼로 희석하여 액체 또는 동결건조된 제제를 만들기에 적합하다.

[0860] [실시예 3]

[0861] 중성 엔도펩티다제에 의한 CNP 변이체들의 생체외 절단

[0862] 중성 엔도펩티다제(NEP) 절단에 대한 CNP 변이체들의 감수성에 대한 아미노산 치환, 아미노산 확장, 백본 변형, 측쇄 변형 및 PEG화의 효과를 결정하기 위해서, 비-절단된 CNP 변이체의 소실을 모니터하는 생체외 분석을 이용하여 펩티드 절단 분석을 수행했다.

[0863] 재조합 사람 NEP(1ug/mL 최종 농도)를 pH 7의 0.1M 트리스에 희석된 100uM의 CNP 변이체에 가했다. 반응 혼합물을 다양한 시간 기간 동안 37℃에서 인큐베이션하고, 반응물을 EDTA(10mM 최종 농도)로 퀀칭한 후, 열 변성을 수행했다. 반응 혼합물을 환원시킨 다음, 반응 산물을 HPLC와 질량분광기를 이용하여 분석했다. 시간에 따른 무손상 CNP 변이체의 소실에 기초하여 CNP 변이체의 반감기를 계산했다. 효소절단된 CNP 변이체들에 대한 결과를 병행하여 수행한 wtCNP22 효소절단과 비교하고, 1mg/mL NEP에 의해 효소절단된 100uM CNP22에 대한 결과에 맞춰 정규화했다($t_{1/2}$ = 80분).

[0864] 표 1은 생체외 NEP 절단 분석에 기초한 백본 또는 측쇄 변형을 가진 다양한 CNP 변이체들의 반감기를 나타낸다. 유사체 L에서 6개의 NEP 절단 부위 중 3개의 제거는 실질적으로 반감기를 단축시켰다. 시험된 CNP 변이체들 중, NEP 절단에 대한 최대 내성은 CNP22의 전체 22개 아미노산의 D-거울상이성질체를 함유하는 유사체 N 및 Leu9와 Leu11에 N-메틸화된 아미드 결합을 가진 유사체 M에서 나타났다. 그러나, 유사체 N과 M은 모두 cGMP의 생산을 자극하지는 못했다(하기 참조).

[0865] 유사체 A, B, E, F, G 및 H의 반감기를 서로 비교하면, 반감기는 유사체 A, B, F 및 H보다 유사체 E 및 G에서 약 1.5 내지 약 2.5배 더 긴 것으로 결정되었다. 이들 6개의 유사체는 모두 wtCNP22에 비해서 Cys-Phe7 결합의 절단에 대해 내성 또는 개선된 내성을 나타냈다(하기 데이터 참조). 1ug/mL에서 NEP에 대한 유사체 내성의 등록 순위는, 반감기에 기초하면, 유사체 G(3-Cl-Phe) ≥ 유사체 E(D-Phe) > 유사체 H("beta-2Phe"), 유사체 B(N-Me-Phe) 및 유사체 F(t-Bu-Gly) = wtCNP22 > 유사체 A(Cys-CH_2-NH)이다. 유사체 E 및 G는 wtCNP22에 비해 반감기가 약 1.5배 더 길다. Cys6-Phe7 결합 절단에 대한 내성 이외에 유사체 B, E, F, G 및 H는 1ug/mL NEP의 존재하에 Gly8-Leu9 결합의 절단에 대한 내성을 또한 나타냈다(데이터 나타내지 않음). 이들 결과는 Cys6과 Gly8 사이에 백본 또는 측쇄 변형을 가진 CNP 변이체들은 Cys6-Phe7 결합 및/또는 Gly8-Leu9 결합의 NEP 절단에 대해 내성일 수 있지만, NEP에 대한 전체적인 내성이 반드시 개선되거나 CNP22보다 반감기가 더 길어지는 것은 아님을 시사한다. 이 결과는 NEP가 CNP22의 Cys6-Phe7 결합을 먼저 절단한 다음, 다른 곳의 결합을 절단한다는 문헌상에 보고된 것과는 반대되는 것이다.

표 1

유사체	백본 및 측쇄 변형	cGMP 반응, 1 uM CNP22[1] 대비		NEP 절단
	나트륨이뇨 펩타이드	10 nM	1 uM	($t_{1/2}$, 분)
	CNP22 (SEQ ID NO: 1)	46 ± 10	100 ± 13	80[2]
N	D-CNP22 (모든 D-아미노산) (SEQ ID NO: 115)	2	1	>> 160
A	CNP22, C6-CH2-NH (환원 카르보닐) (SEQ ID NO: 56)	6	66	55
B	CNP22, N-메틸-F7 (메틸화 아미드) (SEQ ID NO: 57)	2	38	80
BD	CNP22, N-메틸-L9 (SEQ ID NO: 116)	2	8	ND
BN	CNP22, N-메틸-L11 (SEQ ID NO: 117)	10	51	ND
BE	CNP22, N-메틸-L20 (SEQ ID NO: 118)	2	5	ND
M	CNP22, N-메틸-L9, N-메틸-L11 (SEQ ID NO: 94)	1	11	>> 160
K	CNP22, N-메틸-L9, N-메틸-L20 (SEQ ID NO: 92)	1	1	80
L	CNP22, N-메틸-L9, N-메틸-L11, N-메틸-L20 (SEQ ID NO: 93)	18	10	30
J	CNP22, C6-CH2-NH, N-메틸-L9, N-메틸-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-아미노-2-페닐프로피오닐) (SEQ ID NO: 57)	2	2	80
G	CNP22, 3-클로로-F7 (SEQ ID NO: 137)	17	93	135
F	CNP22, t-부틸-G8 (SEQ ID NO: 58)	2	18	80
V	CNP22, K4G, 3,4-디클로로-F7 (SEQ ID NO: 119)	ND	ND	68
X	CNP22, K4G, 3-메틸-F7 (SEQ ID NO: 120)	ND	ND	68
	ANP	10	23	ND

[1] 1 uM CNP22 가 존재할 때의 cGMP 생산에 비해서 나트륨이뇨 펩타이드는 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극한다.

[2] CNP22 NEP 내성 $t_{1/2}$ 평균 80 분. 실험들 간에 NEP 족매 활성에 변동이 있으므로, 모든 CNP22 $t_{1/2}$ 효소분해는 80 분에 맞춰 정규화되었고, 차여 계수를 사용해서 각 실험에서 유사체 $t_{1/2}$을 계산하여 조정된 $t_{1/2}$을 얻었다.

ND = 측정불가

[0866]

[0867] 표 2는 생체외 NEP 절단 분석에 기초한 천연 및/또는 비천연 아미노산 치환을 가진 다양한 CNP 변이체들의 반감기를 나타낸다. 시험된 변이체들 중, NEP 절단에 대한 최대 내성은 K4R 및 G15S 치환을 가진 유사체 BK와 K4R 및 G15N 치환을 가진 유사체 BJ에서 나타났다.

표 2

유사체	특이성 돌연변이	cGMP 반응, 1 uM CNP22[1] 대비		NEP 절단
	나트륨이노 펩타이드	10nM	1uM	($t_{1/2}$, 분)
	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
BQ	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 ± 20	86 ± 17	ND
AA	CNP22, K4R, G8V (SEQ ID NO: 96)	3	25	ND
AC	CNP22, K4R, G8T (SEQ ID NO: 98)	11 ± 2	69 ± 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)	15	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, G15Q (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-부틸-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
BW	CNP22, K4R, G21R (SEQ ID NO: 132)	20	21	ND
	ANP	19	23	ND

[1] 1 uM CNP22 가 존재할 때의 cGMP 생산에 비해서 나트륨이노 펩타이드는 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극한다.

[2] CNP22 NEP 내성 $t_{1/2}$ 평균 80 분. 실험들 간에 NEP 촉매 활성에 변동이 있으므로, 모든 CNP22 $t_{1/2}$ 효소분해는 80 분에 맞춰 정규화되었고, 차이 계수를 사용해서 각 실험에서 유사체 $t_{1/2}$을 계산하여 조정된 $t_{1/2}$을 얻었다.

ND = 측정불가

[0868]

[0869] 표 3은 NEP 절단 분석에 기초한 아미노산 확장을 포함한 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 가진 CNP 변이체들의 반감기를 나타낸다. 시험된 유사체들 중, 유사체 AZ, CC, CF, BL, CS, CK 및 CL, Pro-Gly-CNP37 및 HSA-CNP27이 NEP 변성에 가장 내성이었다.

표 3

	N- 및 C-말단 변형	cGMP 반응, 1 uM CNP22[1] 대비		NEP 절단
	나트륨이뇨 펩타이드	10nM	1uM	($t_{1/2}$, 분
	CNP22	46 ± 10	100 ± 13	80
BC	펜탄산(N-말단)-CNP22, G1E (SEQ ID NO: 109)	ND	ND	ND
BB	펩탄산(N-말단)-CNP22, G1E (SEQ ID NO: 108)	32 ± 4	84 ± 19	45-65
AV	펜탄산(N-말단)-CNP22, G1E, K4E (SEQ ID NO: 106)	ND	ND	120
AW	펩탄산(N-말단)-CNP22, G1E, K4E (SEQ ID NO: 107)	ND	ND	< 20
AX	CNP17 (멜타 N-말단) (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	108 ± 15	≥ 160
	ER-CNP22 (SEQ ID NO: 38)	ND	ND	ND
BA	ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	38 ± 10	113 ± 10	90
	GANRR-CNP22 (SEQ ID NO: 65)	ND	ND	ND
AY	GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	59 ± 9	105 ± 20	65
	GANQQ-CNP22 (SEQ ID NO: 64)	ND	ND	ND
CH	GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	44 ± 6	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 (IgG1(Fc) 단편) (SEQ ID NO: 79)	23 ± 9	72 ± 19	> 160
	PNARKYKGANKK-CNP22 (CNP34)	ND	ND	ND
BL	QEHPNARKYKGANKK-CNP22 (CNP37) (SEQ ID NO: 60)	43 ± 16	97 ± 27	>> 160
	PQEHPNARKYKGANKK-CNP22 (Pro-CNP37)	ND	ND	ND
CE	GERAFKAWAVARLSQ-CNP22 (HSA 단편) (SEQ ID NO: 81)	15	87	ND
CY	GQHKDDNPNLPRGANPR-CNP22 (HSA 단편) (SEQ ID NO: 80)	ND	ND	ND
CQ	GHHSHEQHPHGANQQ-CNP22 (HRGP 단편) (SEQ ID NO: 76)	16	95	ND

[0870]

CX	GHHSHEQHPHGANPR-CNP22 (HRGP 단편) (SEQ ID NO: 78)	ND	ND	ND
CS	GQEHPNARKYKGANPK-CNP22 (변형 CNP37) (SEQ ID NO: 129)	19	61	>> 160
CT	GQEHPNARKYKGANQK-CNP22 (변형 CNP37) (SEQ ID NO: 130)	60	121	ND
CU	GQEHPNARKYKGANQQ-CNP22 (변형 CNP37) (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 (변형 CNP37) (SEQ ID NO: 74)	ND	ND	ND
CR	GAHHPHEHDTHGANQQ-CNP22 (HRGP 단편) (SEQ ID NO: 128)	14 ± 5	77 ± 12	ND
CZ	FQIPMDRIGRNPR-CNP22 (호스테오크린 "NPR-C 억제제") (SEQ ID NO: 82)	ND	ND	ND
DA	GKRTGQYKLGSKTGPGPK-CNP22 (FGF2 "헤파린- 결합 도메인" 단편) (SEQ ID NO: 83)	ND	ND	ND
CK	GQPREPQVYTGANQQ-CNP22, K4R (IgG1(Fc) 단편) (SEQ ID NO: 84)	2	32	≥ 160
CL	GVPQVSTSTGANQQ-CNP22, K4R (HSA 단편) (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 (피브리노겐) (SEQ ID NO: 87)	12	115	ND
CM	GQPSSSSQSTGANQQ-CNP22, K4R (피브리노겐) (SEQ ID NO: 86)	ND	ND	ND
CO	GSTGQWHSESGANQQ-CNP22, K4R (피브리노겐) (SEQ ID NO: 88)	2	33	ND
CP	GSSSSSSSSSGANQQ-CNP22, K4R (징크핑거) (SEQ ID NO: 89)	ND	ND	ND
CD	SPKMVQGSG-CNP17-KVLRRH ("BNP 꼬리") (SEQ ID NO: 68)	25	102	ND
CJ	RSSCFGGRIDRIGAC ("C-ANP4-23", ANP-유래) (SEQ ID NO: 133)	ND	ND	ND

[0871]

	CNP22, K4R, K10R, N-말단--N-말단다이머/디숙신이미딜 글루타레이트 (SEQ ID NO: 134)	19	44	ND
	CNP22, K4R, K10R, N-말단--N-말단 다이머/비스-PEO5 (SEQ ID NO: 135)	19	41	ND
BM	CNP53 (SEQ ID NO: 4)	61	101	>> 160
	ANP	10	23	ND

[1] 1 uM CNP22 가 존재할 때의 cGMP 생산에 비해서 나트륨이뇨 펩타이드는 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극한다.

[2] CNP22 NEP 내성 $t_{1/2}$ 평균 80 분. 실험들 간에 NEP 촉매 활성에 변동이 있으므로, 모든 CNP22 $t_{1/2}$ 효소분해는 80 분에 맞춰 정규화되었고, 차이 계수를 사용해서 각 실험에서 유사체 $t_{1/2}$ 을 계산하여 조정된 $t_{1/2}$ 을 얻었다.

ND = 측정불가

[0872]

[0873] 표 4는 생체외 NEP 절단 분석에 기초한 N-말단에서 PEG(또는 PEO) 폴리머와 콘쥬게이트된 CNP 변이체들의 반감기를 나타낸다. 표 4에 나타낸 시험된 PEG화된 CNP 변이체들은 wtCNP22와 동일한 반감기를 가졌던 PEO12-GANPR-CNP22(K4R)만 제외하고는 모두 NEP 절단에 대해 내성 또는 증진된 내성을 나타냈다. K4G 치환을 가진 CNP22의 N-말단 PEG화는 NEP 내성에 실질적인 개선을 부여하지 않는다. 예를 들어, PEG2K-CNP22(K4G)는 CNP22보다 NEP 절단에 아주 약간 더 내성이었지만(데이터 나타내지 않음), PEG2K-CNP22는 CNP22보다 훨씬 더 긴 생체외 반감기를 가졌다.

표 4

N-말단 PEG 화		cGMP 반응, 1 uM CNP22[1] 대비		NEP 절단
나트륨이뇨 펩타이드	PEG	10nM	1uM	($t_{1/2}$, 분)
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)$_3$ (분지)	17 ± 1	52 ± 8	>> 160
CNP22	PEO24 (1.2 kDa)	8 ± 5	40 ± 10	>> 160
CNP22	PEG1K	15 ± 3	68 ± 17	> 160
CNP22	PEO12 (0.6 kDa)	12 ± 7	57 ± 18	160
CNP22	(PEO12)-Biotin	19	81	140
CNP22, K4G	(PEO12)-Biotin	10	27	100
CNP22, K4R	PEO24	15	56	ND
CNP22, K4R	PEO12	13	44	ND
CNP-17	PEG2K	5	50	> 160
R-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 41)	PEO24	15 ± 2	75 ± 12	ND
R-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 41)	PEO12	23 ± 2	93 ± 19	≥ 160
ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	PEO24	6 ± 2	60 ± 10	ND
ER-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 39)	PEO12	20 ± 1	92 ± 25	ND
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEG2K	15 ± 2	45 ± 18	ND
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEO24	28 ± 9	82 ± 18	>> 160
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEG1K	15 ± 0.4	56 ± 23	> 160
GANRR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 36)	PEO12	40 ± 2	99 ± 13	> 160
GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	PEO24	16 ± 13	73 ± 30	ND
GANQQ-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 69)	PEO12	30	78	ND
GANPR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 37)	PEO24	ND	ND	ND
GANPR-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 37)	PEO12	ND	ND	80
GANSS-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 70)	PEO24	8 ± 5	46 ± 21	ND
GANSS-CNP22, K4R (SEQ ID NO: 70)	PEO12	8 ± 0.3	52 ± 13	ND

[1] 1 uM CNP22 가 존재할 때의 cGMP 생산에 비해서 나트륨이뇨 펩타이드는 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극한다.

[2] CNP22 NEP 내성 $t_{1/2}$ 평균 80 분. 실험들 간에 NEP 족매 활성에 변동이 있으므로, 모든 CNP22 $t_{1/2}$ 효소분해는 80 분에 맞춰 점규화되었고, 차이 계수를 사용해서 각 실험에서 유사체 $t_{1/2}$을 계산하여 조정된 $t_{1/2}$를 얻었다.

ND = 측정불가

[0874]

[0875] 도 16은 CNP22의 5개의 N-말단 PEG화된 콘쥬게이트의 NEP 내성 프로파일을 나타낸다. 질량이 증가하는 PEG(또는 PEO) 폴리머들에 콘쥬게이트된 CNP22 펩티드들은 NEP 변성에 대해 내성이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, PEO24-CNP22, PEG2K-CNP22 및 PEG5K-CNP22는 160분의 분석기간 동안 NEP 변성에 내성이었다.

[0876] 도 17은 N-말단 아미노산이 확장된 CNP 변이체들인 CNP37(유사체 BL), CNP53 및 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 NEP 내성 프로파일을 나타낸다. CNP37과 CNP53은 모두 이 생체외 분석에서 NEP 변성에 내성이었지만, GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 NEP 가수분해에 대한 불안정성이 CNP22와 동일함을 확인할 수 있었다.

[0877] 도 18은 N-말단에서 PEG(또는 PEO) 부분에 콘쥬게이트된 CNP17 및 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 NEP 내성 프로파일을 나타낸다. GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 PEG화는 이 CNP 변이체의 NEP 내성을 크게 개선했는데, PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)는 160분의 분석기간 동안 NEP 절단에 완전히 내성이었다.

약 0.6kDa(PEO12)에서 약 1.2kDa(PEO24)까지 PEO 부분의 질량 증가는 PEG화된 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 NEP 내성을 개선했다. 또한, 다분산성 PEG1K 부분보다는 단분산성 PEO24에 의한 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 PEG화가 NEP 내성을 개선했다. 마지막으로, PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)와 PEG2K-CNP17는 유사한 총 질량을 갖지만(PEG2K가 다분산성이라는 점을 염두에 두고), 전자의 것이 실질적으로 보다 나은 NEP 내성을 나타냈다.

[0878] 또한, wtCNP22와 CNP 변이체들인 G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27("CNP27-HSA", 서열번호 144) 및 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36)를 대상으로 NEP 내성 분석을 수행했다. 도 19는 G-CNP37과 CNP27-HSA가 NEP 절단에 완전히 내성이었고, CNP27-PEO12는 wtCNP22에 비해서 NEP 변성에 훨씬 더 큰 안정성을 나타냈음을 보여준다.

[0879] [실시예 4]

[0880] NIH3T3 세포에서 cGMP 생산의 CNP 변이체 자극

[0881] CNP 변이체들의 기능적 활성을 결정하기 위해서, CNP 변이체들에 노출된 NIH3T3 세포들에서 cGMP의 생산을 측정했다. 뮤린 NIH3T3 세포는 사람 NPR-B와 98%의 단백질 서열 동일성을 갖는 CNP 신호화 수용체인 NPR-B를 내인성 발현한다. NIH3T3 세포를 10% 태아 소 혈청과 항생물질로 보충된 Dulbecoo 변형 이글 배지에서 37℃에서 5% 이산화탄소와 함께 배양했다. 신호화 24~48시간 전에, 분석 시점에서 세포를 12-웰 플레이트에 2~5 x 10^5 세포/웰의 밀도로 계대 배양했다. CNP 변이체들을 1mg/mL(wtCNP22는 455uM)의 스톡 농도로 1mM HCl에 재현탁하고, 이어서 인산염 완충 식염수(PBS)로 30uM 작업 스톡 용액으로 희석했다. 인산염 완충 식염수로 10배 연속 희석물을 제조했다. 세포로부터 배양 배지를 제거하고, 배지를 0.75mM 이소부틸메틸크산틴을 함유하는 0.4mL PBS/Dulbecco 변형 이글 배지(50/50, v/v)로 치환했다. 플레이트를 15분 동안 5% 이산화탄소와 함께 37℃에서 인큐베이션한 후, PBS 중의 0.2mL CNP 변이체를 첨가하여, 15분 동안 37℃에서 인큐베이션을 계속했다. CatchPoint cGMP 분석 키트(Molecular Devices)와 함께 제공된 0.2mL 세포용해 버퍼를 첨가해서 반응을 중단시키고, CatchPoint cGMP 분석(Molecular Devices)에 따라서 cGMP 생산을 측정했다. 모든 자극 실험은 중복 수행했다.

[0882] 표 1~4는 백본 또는 측쇄 변형, 아미노산 치환, N-말단 아미노산 확장 및/또는 N-말단 PEG화를 갖는 CNP 변이체들의 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산을 자극하는 능력을 각각 나타낸다. 4개 표에서 모두 10nM 또는 1uM CNP 변이체에 노출된 NIH3T3 세포에서 cGMP 생산값은 세포수 및 1uM wtCNP22의 존재하의 cGMP 생산에 맞춰 정규화된다.

[0883] 표 1의 결과에서, 7번 위치에 3-Cl-Phe를 갖는 유사체 G만 1uM에서 NPR-B 자극 활성이 wtCNP22와 실질적으로 동일한 것으로 나타났다. 표 2에서는 유사체 AH, BO, AB, BH, BZ, BX 및 BR을 포함하는, 아미노산 치환을 가진 다수의 CNP 변이체들이 wtCNP22와 실질적으로 유사한 NPR-B 자극 활성을 나타냈다.

[0884] 표 3의 결과를 보면, 아미노산 확장을 포함하는 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 가진 많은 CNP 변이체들이 wtCNP22와 비슷한 NPR-B 자극 활성을 나타냈다. 기능적 CNP 변이체는 N-말단에 헵탄산이 부착된 CNP22(G1E)인 유사체 BB, 및 BNP의 N-말단 및 C-말단 "꼬리"에 CNP22의 고리형 도메인(Cys6-Cys22 서열을 보유한 "CNP17")이 콘쥬게이트된 유사체 CD를 포함한다. 도 20은 GANRR-CNP22(K4R), CNP37(서열번호 36)(유사체 BL) 및 CNP53이 모두 이 생체외 분석에서 wtCNP22와 유사한 NPR-B 자극 활성을 가졌음을 도시한다.

[0885] 표 3으로부터, CNP 기능성과 NEP 내성에 대해 분석된 CNP 변이체들 중에서 유사체 AZ(R-CNP22(K4R)), 유사체 CC, 유사체 CF, 유사체 BL(CNP37), 유사체 DB(Gly-CNP37) 및 GHKSEVAHRFK-CNP27(HSA-CNP27)(서열번호 144)는 모두 NEP 절단에 대해 CNP22보다 실질적으로 더 내성이면서 CNP22와 실질적으로 유사한 NPR-B 자극 활성을 가졌음이 주지된다.

[0886] 표 4의 결과에서, 9개의 N-말단 PEG화된 CNP 변이체들은 1uM에서 wtCNP22에 의해 달성된 수준의 적어도 약 70%까지 cGMP 생산을 자극했다. 몇 가지 주목할 만한 양태가 표 4에서 보인다. 먼저, 단분산성 PEO 폴리머에 의한 GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 N-말단 PEG화는(PEO12는 약 0.6kDa, PEO24는 약 1.2kDa) 다분산성 PEG 폴리머보다 NPR-B 기능성을 더 낫게 개선했다(PEG1K는 약 1kDa의 수 평균 분자량(Mn)을 갖는 폴리머이고, PEG2K는 약 2kDa이다)(도 21 참조). 둘째, Mn이 증가하는 다분산성 PEG 폴리머들(PEG1K, PEG2K, PEG5K 및 PEG20K) 또는 질량이 큰 단분산성 폴리머(PEO12 및 PEO24)에 의한 wtCNP22의 N-말단 PEG화는 CNP 변이체들의 NPR-B 활성화 능력을 상응하여 감소시켰다(도 22 참조). 셋째, N-말단에 GANRR(서열번호 8) 확장을 가진 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 PEO24-CNP22 및 PEO24-CNP22(K4R)보다 cGMP 생산을 더 많이 자극했다. 또한, CNP 기능성과 NEP 내성에 대해 분석된 N-말단 PEG화된 CNP 변이체들 중에서 PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-

CNP22(K4R)(서열번호 36) 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 모두 CNP22보다 NEP 변성에 대해 훨씬 더 내성이면서 CNP22와 실질적으로 유사한 NPR-B 자극 활성을 가졌음이 주지된다.

[0887] CNP 기능성과 NEP 내성에 대해 분석된 표 1~4에 제시된 CNP 변이체들 중에서 유사체 G, BK, AZ, CC, CF, BL, DB, Pro-Gly-CNP37, HSA-CNP27(GHKSEVAHRFK-CNP27)(서열번호 144), PEG1K-CNP22, (PEO12)-비오틴-CNP22, PEO12-R-CNP22(K4R), PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36), 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 모두 wtCNP22보다 NEP 절단에 대해 실질적으로 더 내성이면서 wtCNP22와 실질적으로 유사한 NPR-B 자극 활성을 가졌다.

[0888] 또한, wtCNP22과 CNP 변이체들인 G-CNP37, GHKSEVAHRFK-wtCNP27("CNP27-HSA", 서열번호 144), wtCNP29 및 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36)를 대상으로 cGMP 생산 분석을 수행했다. 도 23은 분석된 CNP22와 모든 CNP 변이체들이 저 용량 또는 고 용량의 CNP에서 유사한 수준의 cGMP 생산을 유도했음을 나타낸다.

[0889] [실시예 5]

[0890] NPR-A, NP-B 및 NPR-C에 대한 결합 특이성

[0891] 신호화 경쟁 분석

[0892] 제거 수용체 NPR-C에 대한 CNP 변이체들의 결합 특이성을 결정하기 위해서 신호화 경쟁 분석을 수행한다. 사람 NPR-B 또는 NPR-C(각각 OriGene에서 구입)의 발현 플라스미드를 일시적으로 트랜스펙션하고, 수용체를 HEK293T 세포에서 발현시킨다. 트랜스펙션 40시간 후, NPR-B, NPR-C 및 천연 HEK293T 세포를 수거하여 계수한 다음, 12-웰 또는 96-웰 플레이트에 1:1(NPR-B 세포 : NPR-C 또는 천연 HEK293T 세포)의 비율로 평판한다. 평판 20시간 후, 세포를 실시예 4에 설명된 NPR-B/cGMP 자극 분석 처리한다. 존재할 경우, 나트륨이뇨 제거 수용체인 NPR-C는 CNP에 결합하여 내재화됨으로써 NPR-B를 통한 신호화에 이용할 수 있는 전체 CNP 농도를 감소시킬 것으로 예상되고, 그 결과 cGMP 생산이 감소되고, 용량-반응 곡선이 오른쪽으로 이동된다. 용량-반응 곡선의 우측 이동이 wtCNP22에 대해 검증되었다. NPR-C에 대한 친화성이 감소된 CNP 변이체들은 용량-반응 곡선에서 우측 이동을 유도하지 못하거나, 아니면 약간의 이동만을 유도할 것으로 예상된다. 이 신호화 경쟁 분석은 Cunningham에 의해서 이미 설명된 것과 유사하다(미국특허 제5,846,932호; B. Cunningham, EMBO J. 13(11): 2508-2515 (1994); H. Jin et al., J. Clin. Invest. 98(4): 969-976 (1996)).

[0893] NPR-B 및 NPR-A를 통한 wtCNP-22, Pro-Gly-wtCNP37 및 ANP의 cGMP 자극 활성 및 이들의 NPR-C와 비교한 NPR-B에 대한 선택성과 NPR-C와 비교한 NPR-A에 대한 선택성을 신호화 경쟁 분석에서 평가했다. NPR-A, NPR-B 및 NPR-C를 HEK293T 세포에 각각 일시적으로 트랜스펙션했다. 트랜스펙션 30시간 후, 세포를 96-웰 플레이트에 다음과 같이 평판했다: (A) 20,000 NPR-B 세포 + 20,000 모의 트랜스펙션된 세포; (B) 20,000 NPR-B 세포 + 20,000 NPR-C 세포; (C) 20,000 NPR-A 세포 + 20,000 모의 트랜스펙션된 세포; 및 (D) 20,000 NPR-A 세포 + 20,000 NPR-C 세포. 평판 20시간 후, 배양 배지를 제거하고, 배지를 혈청-무함유 배지:PBS(1:1)+0.75uM IBMX로 교환하여 15분 동안 배양했다. NPR-B를 통한 cGMP 신호화의 경우, ANP, CNP22 및 Pro-Gly-CNP37의 일련의 용량을 가하고, 37℃에서 12분 동안 인큐베이션한 후, 세포용해에 의해서 분석을 중단했다. NPR-A를 통한 cGMP 신호화의 경우, CNP22 및 Pro-Gly-CNP37의 일련의 용량을 37℃에서 12분 동안 인큐베이션했고, ANP의 일련의 용량을 37℃에서 6분 동안 인큐베이션했다(NPR-A는 NPR-B보다 "더 빠른" 구아닐릴 시클라제인 것으로 나타났기 때문에, ANP의 인큐베이션 시간을 짧게 해서 ANP에 의한 신호화시 너무 빨리 최대값(모든 세포성 GTP의 소진)에 도달하지 않도록 했다). 도 24a 및 b는 CNP-22 및 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")이 NPR-A를 통한 것과 유사한 용량-반응 곡선을 나타내면서 그것보다는 훨씬 더 큰 정도까지 cGMP 생산을 자극했으며, 신호화 경쟁 분석에서는 NPR-B 대 NPR-C 선택성에 대해서 유사한 프로파일을 나타냈음을 보여준다.

[0894] NPR-A, NPR-B 및 NPR-C에 대한 결합 친화성(Ki)의 결정

[0895] NPR-A, NPR-B 및 NPR-C에 대한 CNP 변이체들의 결합 친화성(Ki)을 이종성 경쟁 결합 분석에서 결정한다(미국특허 제5,846,932호; B. Cunningham, EMBO J. 13(11): 2508-2515(1994); H. Jin et al., J. Clin. Invest. 98(4): 969-976(1996)). 사람 NPR-A, NPR-B 또는 NPR-C를 발현하는 HEK293 세포, 또는 다른 적합하게 트랜스펙션될 수 있는 셀라인(예를 들어, HeLa 세포)으로부터 얻은 막을 방사성-표지 리간드 결합 분석을 위해서 제조한다. 막 제제를 적합한 버퍼로 희석하고, 다양한 농도의 wtCNP22 또는 CNP 변이체(경쟁자)에 I125-표지된 wtCNP22(Bachem)를 가했다. 리간드/수용체 평형이 달성될 때까지 샘플을 실온에서 인큐베이션하고, PVDF 필터 멤브레인을 통해 여과하여 자유 펩티드로부터 결합된 펩티드를 분리한다. 필터를 세척한 후, 섬광제를 첨가해

서 섬광 계수기에서 계수한다. 경쟁자 펩티드의 각 농도에 대해 결합은 2번 측정한다. CNP 변이체 친화성(Ki, 평형해리상수) 및 Bmax(수용체 수)를 비선형 회귀 분석 및/또는 Cheng-Prusoff 식에 의해서 계산한다.

[0896] NPR-C에 감소된 친화성을 나타내는 CNP 변이체들은 NPR-C에 의한 제거에 대해 감소된 감수성을 가질 것으로 예상되며, 따라서 더 긴 혈장 또는 혈청 반감기를 가질 것이다. 순환계에서 CNP 변이체들의 증가된 반감기는 치료 활성 측면에서 변이체들의 활용성을 증가시킬 것이다.

[0897] [실시예 6]

[0898] 래트 연골육종(RCS) 세포의 성장 및 RCS 세포에서 cGMP 생산에 대한 CNP 변이체들의 효과

[0899] 뼈 성장을 자극하는 CNP 변이체들의 능력을 평가하기 위해서, 섬유아세포 성장인자 2(FGF-2)로 래트 연골육종(RCS) 세포를 처리함으로써 세포 배양물에서 골격 이형성증을 모의 실험한다. 섬유아세포 성장인자 2는 섬유아세포 성장인자 수용체 3(FGFR-3)을 활성화함으로써 성장 중단을 유도한다(Krejci et al., J. Cell Sci., 118(21):5089-5100 (2005)).

[0900] CNP 농도(0.05, 0.1, 0.2 및 0.5uM), 처리기간 및 간격(연속; 2.5분, 10분, 30분, 1시간r, 2시간, 4시간 및 8시간 하루 1회; 2.5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간 및 4시간 하루 2회)를 변화시킴으로써 최적 CNP 처리 파라미터를 결정한다. 72시간 후, 자동 세포 계수기에서 세포를 계수하고, 알시안 블루(alcian blue) 염색을 이용해서 세포외 바탕질의 양을 추산한다.

[0901] 다음에, RCS 세포를 wtCNP22를 이용한 성장 실험에서 결정된 최적 조건에서 CNP 변이체으로 처리한다. 미처리된 RCS 세포, CNP로 처리된 RCS 세포, 및 CNP 변이체으로 처리된 RCS 세포에 대해 경쟁 ELISA에 의해 cGMP의 농도를 측정한다. 또한, CNP 변이체 처리에 의한 세포 성장 및 바탕질 합성을 모니터하여 CNP 처리에 의한 결과와 비교한다.

[0902] 사람 세포 배양물 시스템에서 CNP 변이체들의 효과를 평가하기 위해서, 알기네이트 비드에서 1차성 재분화 사람 연골세포를 wtCNP22 및 CNP 변이체들로 처리하고, 유효 CNP 신호화의 척도로서 경쟁 ELISA에 의해 cGMP 농도를 측정한다.

[0903] 본원에 설명된 방법을 사용해서 생체외 래트 연골육종 세포의 성장 및 이들 세포에서 cGMP 생산을 자극하는 CNP 변이체들의 능력을 평가할 수 있다.

[0904] [실시예 7]

[0905] 래트 연골육종 세포에서 용량 반응 연구

[0906] 연골세포 성장의 마이너스적 조절제인 티로신 키나제 수용체 섬유아세포 성장인자 수용체 3(FGFR-3)은 연골무형성증 대상에 구성적으로 존재한다. FGF-2에 의한 FGFR-3 수용체의 자극은 Erk MAPK의 연장된 활성화에 의해서 성장을 중단시키고, 바탕질 합성 감소와 바탕질 손실을 야기하며, 세포 모양을 변화시킨다. 섬유아세포 성장인자 2(FGF-2)에 래트 연골육종(RCS) 세포의 연속 노출은 FGFR-3를 활성화하고 성장 중단을 유도하여 세포 배양물에서 연골무형성증을 자극한다(Krejci et al., J. Cell Sci., 118(21): 5089-5100 (2005)). 뼈 세포의 충분한 성장을 자극하는 CNP 변이체의 용량과 투약 빈도를 결정하기 위해서, 실시예 6에 설명된 대로 RCS 세포 분석을 이용하여 용량 반응 연구를 수행했다.

[0907] RCS 세포를 24-웰 플레이트에 10 x 10^3 세포/웰로 파종하여 24시간 동안 성장시킨 다음, 72시간 동안 처리하여 계수했다. RCS 세포를 FGF-2(5ng/mL)에 계속 노출시켜 구성적으로 활성인 FGFR-3을 자극해서 세포 성장 중단을 유도했다(도 25의 #5 막대 참조). 야생형 CNP22(0.2uM)를 연속(72시간), 1일 1시간씩 또는 1일 2시간씩 배양했다. 모든 자극제는 매일 교환했다. 5.0ng/mL FGF-2의 존재하에 0.2uM CNP22에 RCS 세포의 연속 노출은 FGF2-유도 성장 중단을 부분적으로 반전시켰으며, 이로써 CNP22의 부재하에 대략 100 x 10^3 세포/웰 성장한 것(도 25 #5 막대)과 비교하여 대략 200 x 10^3 세포/웰(도 25 #6 막대) 성장했다.

[0908] 하루 1번 CNP22(0.2uM)에 1시간 노출하는 경우와 하루 1번 CNP22(0.2uM)에 2시간 노출하는 경우에 모두 연골세포 성장에 대한 연속 CNP22(0.2uM) 노출 효과의 약 84%가 달성되었다(도 25 #7 및 #8 막대). 이들 결과는 CNP22에 성장-중단된 연골세포의 연속 노출이 세포 성장 중단의 반전에 꼭 필요하지는 않다는 것을 증명한다. 추가로, 용량 반응 연구는 더 낮은 용량의 CNP22도 성장 중단을 반전시킬 수 있음을 증명한다(도 26a).

[0909] 또한, 세포외 바탕질의 조직학적 분석과 세포 형태학적 분석은 CNP22 처리가 연골육종 세포외 바탕질의 FGF2-매

개 손실에 길항작용을 했고, 바탕질 합성을 증가시켰음을 나타냈다. FGF-2 노출은 바탕질 합성의 감소와 변성의 증가를 가져온 반면, FGF-2 세포 배양물에 CNP22를 첨가한 경우 바탕질 합성이 증가되었으며, 바탕질에 35S-술페이트 및 3H-Pro 편입시키거나, 또는 바탕질로부터의 감소에 의해 평가한바 FGF2를 부분적으로 억제했다(도 27a~d). FGF2 및 CNP22와 함께 배양된 RCS 세포에서 아글리칸 및 피브로넥틴 생산(mRNA 및 단백질)의 분석은 FGF-2가 아글리칸 수준을 감소시켰고, 피브로넥틴 수준은 증가시켰음을 나타내는데, 이것이 CNP22의 첨가에 의해 억제되었다(도 28a~c). FGF-2는 주로 Erk를 통해 바탕질-가공 분자를 유도하여 활성화하며, CNP22의 첨가는 이런 활성화에 일부 효과를 나타낸다.

[0910] 크리스탈 바이올렛 염색과 같은 성장 중단을 측정하기 위한 추가의 고 처리량 분석이 RCS 세포에 대한 CNP22와 그것의 변이체들의 효과를 측정하는데 유용하다.

[0911] 본원에 설명된 CNP 변이체들을 가지고 유사한 용량 반응 연구를 수행하여 RCS 세포의 FGF2-유도 성장 중단을 반전시키기 위한 유효 용량을 결정할 수 있다.

[0912] [실시예 8a]

[0913] 경증 연골무형성증을 가진 마우스에서 경골 및 대퇴골 성장의 생체외 자극

[0914] 마우스 경골의 기관 배양 모델을 사용하여 길이방향 뼈의 성장을 자극하는데 있어서 야생형 CNP22의 효능을 증명했다. 6일 동안 10^{-8}, 10^{-7} 또는 10^{-6}M의 CNP22를 사용하여 야생형 마우스의 경골을 처리한 경우 길이방향 성장이 각각 31%, 40% 및 42%까지 증가했다. 또한, 조직학적 평가에서는 비대성 구역의 확장, 예를 들어 성장판의 비대성 연골세포의 수와 크기의 증가가 나타났다(Agoston et al., BMC Dev. Biol. 7:18 (2007)). $FGFR3^{Ach}$ 마우스로부터 분리된 경골에서도 유사한 소견이 관찰되었다(Yasoda et al., Nat. Med. 10: 80-86 (2004)).

[0915] 길이방향 뼈 성장의 자극에서 CNP 변이체들의 효능을 측정하기 위해서, 야생형 마우스와 경증 연골무형성증의 마우스 모델인 사람 FGFR-3 유전자에 G380R 돌연변이를 가진 트랜스젠 마우스($FGFR3^{wt/Ach}$ 이형접합체)의 연골내 뼈 성장의 마우스 기관 배양 모델에서 CNP 변이체들을 시험했다. 간단히 말해서, 야생형과 $FGFR3^{wt/Ach}$의 한배새끼들로부터 분리된 배아 또는 갓 태어난 마우스 경골의 기관 배양 모델에서 야생형 CNP22와 CNP 변이체들의 약물학적 활성을 비교했다. 전체적인 뼈 성장과 성장판의 조직학적 변화를 평가했다. 또한, 컨디셔닝 배양 배지를 세포내 신호화(cGMP), 연골 대사(II형 콜라겐, 그외 콜라겐, 아그레칸 콘드로이틴 술페이트), 뼈 대사(뼈 알칼리성 포스파타제, 오스테오칼신, I형 콜라겐[C-텔로펩티드, N-텔로펩티드]) 및 염증(인터류킨-1, 인터류킨-6, 인터류킨-11)의 생체마커들에 대해 평가한다.

[0916] 예를 들어, cGMP의 생산을 자극하는 능력과 길이방향 뼈 성장의 증가와 성장판의 비대성 구역의 세포 확장에 의해 측정되는 뼈 성장에 기초해서 효과적인 CNP 변이체들을 확인한다.

[0917] 뼈 성장의 측정

[0918] 대퇴골의 길이방향 성장의 자극에 있어서 wtCNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효능을 마우스 기관 배양 모델에서 평가했다. 이들 실험을 위해서, 2~3일령 야생형 마우스로부터 대퇴골을 분리해서 0.2% BSA, 0.5mM L-글루타민, 40 유닛 페니실린/mL 및 40ug 스트렙토마이신/L로 보충된 알파 MEM 중에서 부형제, CNP22 또는 CNP 변이체들의 존재하에 8일 동안 배양했다. 제0일에 처리를 시작해서, 이후 배지를 교환하면서 2일마다 반복했다. 1cm 접안경 망선이 장착된 해부 현미경을 사용하여 처리 전과 이후 2일마다 뼈를 측정했다. 컨디셔닝 배지를 생체마커 분석에 사용했다. 제8일에 뼈를 4% 파라포름알데히드에 24시간 동안 고정시킨 후, 5% 포름산에서 24시간 동안 석회질을 제거하고, 탈수하여 파라핀에 매립했다. 뼈를 5um(마이크론) 크기의 절편으로 자른 다음, 파라핀을 제거하고 다시 수화시켜서 Alcian Blue로 30분 동안 염색했다(pH 2.5; MasterTech). Alcian Blue는 연골을 청색으로 염색시킨다. 염색된 절편을 시각화해서 명시야 현미경으로 촬영했다. 성장판 연골의 비대성 영역의 두께를 이미지 분석에 의해 측정했다.

[0919] 도 29는 2일마다 CNP 펩티드로 치료된 3일령 야생형 마우스에서 대퇴골의 길이방향 성장에 대한 wtCNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 효과를 예시한다. 결과를 치료 전(제0일) 측정값에 맞춰 정규화하였다. 이 연구를 3번(부형제) 또는 4번(CNP 펩티드) 중복하여 수행하였다. 도 29에 도시된 대로, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 물론 CNP22도 대퇴골의 길이방향 성장을 자극하는데 효과적이었으며, N-말단 PEG화된 CNP 변이체가 가장 효과적이었다.

[0920] CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)에 대한 반응으로서 야생형 및 FGFR3^{ach} 마우스에서 대퇴골 및 경골의 성장을 또한 평가했다. 야생형 마우스 또는 연골무형성증 마우스(FGFR3^{ach})의 경골 배양물에서는 CNP37와 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)가 모두 부형제 또는 CNP22와 비교해서 경골의 길이방향 성장을 증가시킨 것으로 나타났다(도 30 및 31). CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)는 또한 야생형 마우스에서 대퇴골의 성장을 자극했다(도 32). 또한, CNP22, PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36) 및 CNP37은 각각 부형제와 비교해서 FGFR3^{ach} 마우스에서 대퇴골의 길이방향 성장을 증가시켰다(도 33).

[0921] 또한, FGFR3^{ach} 마우스 경골의 성장판에서의 CNP37의 분포를 생체외 평가했다. 뼈 샘플을 상기 설명된 대로 제조했다. 파라핀 절편을 잘라서 60℃에서 1시간 동안 열 고정했다. 37℃(30분)에서 1% 히알루로니다제를 사용하여 항원을 복구하고, 이어서 1시간 동안 혈청 차단을 수행했다(10% 정규 염소 혈청). CNP22 항원(1:500 희석: Peninsula Laboratories Inc., 캘리포니아 산카를로스)을 4℃에서 하룻밤 적용했다. 면역검출을 위해, Vectastain ELITE ABC 키트(Vector, 캘리포니아 버링게임)를 제조자의 지시에 따라서 사용했다. DAB 기질 키트(Vector)와 함께 인큐베이션하여 특이적으로 결합된 퍼옥시다제를 시각화하고, 3분 동안 반응을 전개시켰다. 다음에, 슬라이드를 탈수하여 장착한 후 명시야 현미경으로 촬영했다. FGFR3^{ach} 마우스 경골의 성장판에서 CNP의 염색은 CNP 면역반응성이 관절 영역과 비대성 연골세포 영역에서 증가했음을 나타냈으며(도 34), 이는 CNP37이 연골세포로 송달되었음을 시사한다.

[0922] 뼈 성장판에서 CNP 변이체들의 분포에 더하여, FGFR3^{ach} 및 야생형 성장판에서 세포에 대한 CNP37, CNP22 및 부형제의 생체외 효과, 예를 들어 비대성 세포 크기 및 증식성 구역의 세포충실성을 또한 평가했다. 상기 설명된 대로 뼈 샘플을 제조했으며, Alcian Blue 염색이 과정에 포함된다. 전체 기부 성장판의 이미지를 4x 확대 촬영했다. 연골의 골단측에서 시작해서 성장판을 세 구역으로 나누었다: 휴지 구역(개별적인 작은 연골세포), 증식성 구역(뼈의 장축과 평행한 방향의 적층된 연골세포들의 칼럼) 및 비대성 구역(큰 연골세포와 연골세포들 사이의 얇은 격막). 이들 영역에서 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 칼럼당 증식성 연골세포의 수와 비대성 연골세포의 밀도를 측정했다. 비대성 구역의 5곳의 상이한 영역에서 사각형 시험편(4x4㎟)을 사용하여 비대성 연골세포의 밀도를 측정했다. 비대성 연골세포의 세포 크기를 1을 측정된 세포 밀도로 나누어 계산했다. 증식성 칼럼의 세포충실성은 야생형과 FGFR3^{ach} 마우스에서 모두 CNP37과 CNP22에 의해서 증가했다(도 35b 및 c). 또한, FGFR3^{ach} 마우스에서는 CNP22 또는 CNP37과 함께 배양한 결과로서 연골세포의 비대화가 증가되었다(도 36b 및 c).

[0923] 마우스 뼈 배양물의 생체외 연구는 CNP37이 성장판으로 송달되어 연골세포의 세포충실성과 비대화를 증가시킬 수 있었음을 나타냈는데, 이것은 성장판 확장 및 길이방향 뼈 성장과 관련된다. 생체내 연구에서 뼈 성장판에서 CNP37의 생체분포와 성장판에 대한 CNP37의 효과(총 성장판 두께, 비대성 구역 두께 및 증식성 구역의 세포충실성)를 평가하기 위해서, 상기 설명된 대로 부형제 또는 CNP37로 치료된 FGFR3^{ach} 마우스로부터 뼈 샘플을 얻었다. 생체분포 및 생체내 효과 연구에서는 경골을 고정해서 70% 에탄올에 저장했다. 면역조직화학을 위해, 샘플을 2일 동안 5% 포름산에 넣어두어 석회질을 제거하고 탈수시켜 파라핀에 매립했다. 뼈를 5um(마이크론) 크기의 절편으로 자른 다음, 파라핀을 제거하고 다시 수화시켜서 상기 설명된 대로 CNP 면역조직화학에 사용했다. 세포 이미지 분석을 위해, 뼈를 5um(마이크론) 크기의 절편으로 자른 다음, 파라핀을 제거하고 다시 수화시켜서 30분 동안 Alcian Blue(pH 2.5; MasterTech)로, 그리고 30초 동안 헤마톡실린 및 에오신으로 염색했다. 염색된 절편을 시각화하고, 명시야 현미경으로 촬영했다. 성장판과 증식성 구역 및 비대성 구역의 두께를 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정했다.

[0924] 생체내 생체분포 연구는 생체외 연구와 유사하게 CNP 면역반응성이 CNP37로 치료된 FGFR3^{ach} 마우스의 경골 성장판의 관절 영역과 비대성 연골세포 영역에서 증가되었음을 증명했으며, 이는 CNP37이 FGFR3^{ach} 마우스 경골의 성장판으로 생체내 송달되었음을 시사한다(도 37). 또한, CNP37 치료는 생체내 연구에서 FGFR3^{ach} 마우스 경골에서 총 성장판 두께, 증식성 구역 두께 및 비대성 구역 두께를 유의하게 증가시켰다(도 38a~c).

[0925] 이들 결과는 본 발명의 CNP 변이체들이 야생형 동물과 연골무형성증 동물의 성장판에 침투해서, 연골세포의 수와 크기를 증가시키고, 성장판의 증식성 구역과 비대성 구역의 두께를 증가시키고, 치료된 야생형 동물과 연골

무형성증 동물에서 길이방향 뼈 성장을 증가시킨다는 것을 증명한다. 따라서, CNP 변이체들은 연골무형성증 대상에서 뼈 성장을 자극하는데 유용하다.

[0926] 생체마커의 측정

[0927] CNP 변이체들에 대한 반응으로서 뼈 성장을 측정하는 것에 더하여, CNP 변이체들에 대한 반응으로서 유도된 연골과 뼈의 형성 및 성장에 대한 생체마커들의 수준을 분석하는 것이 뼈 성장에 대한 CNP 변이체들의 효과를 평가하는데 유용하다.

[0928] 상기 설명된 대로 야생형 및 $FGFR3^{ach}$ 마우스로부터 대퇴골과 경골을 분리했다. 뼈를 2일마다 배지를 교환하면서 8일 동안 CNP22 또는 그것의 변이체과 함께 배양했다. 제8일에 배지를 수거해서 연골 재편성의 연골-특이적 마커인 cGMP(고리형 구아노신 3', 5' 고리형 모노포스페이트) 및 절단된 II형 콜라겐 단편들의 생체마커들에 대해 분석했다. 양 마커는 모두 시판되는 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)을 사용해서 제조자의 프로토콜에 따라서 cGMP(Cayman Chemical Co., 미시간 앤아버)와 절단된 II형 콜라겐(Cartilaps)에 대해 측정했다.

[0929] CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)에 노출한 후에 세포 배양 추출물로부터 cGMP 및 II형 콜라겐 단편들의 수준을 측정했다. 도 39~42는 CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에 외식된 야생형 마우스와 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 대퇴골 및 경골의 노출 후에 배지 중의 cGMP 수준의 큰 증가를 나타낸다($p < 0.01$). 이에 더하여, CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에 야생형 및 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골의 노출은 절단된 II형 콜라겐의 수준을 증가시켰으며, 처리된 $FGFR3^{ach}$ 마우스 대퇴골은 II형 콜라겐 단편들의 수준의 유의한 증가($p < 0.05$)를 나타냈다(도 43). II형 콜라겐 단편들의 상승된 수준은 연골 바탕질의 재편성을 시사하며, 뼈의 성장에서 연골 재편성은 전형적으로 새로운 뼈 형성에 선행하여 일어난다.

[0930] [실시예 8b]

[0931] 중증 연골무형성증을 가진 마우스로부터 얻은 대퇴골의 성장의 생체외 자극

[0932] 중증 연골무형성증을 가진 마우스에서 얻은 뼈의 성장에 대한 CNP 변이체의 효과를 생체외 평가했다. 이 연구에서는 중증 연골무형성증의 마우스 모델인 Y367C 돌연변이를 가진 사람 FGFR-3 유전자를 발현하는 트랜스젠 마우스($FGFR3^{Y367C}$)를 사용했다[S. Pannier et al., Biochim. Biophys. Acta, 1792(2):140-147 (2009)]. 16.5일된 배아에서 대퇴골을 분리해서 1uM Pro-Gly-CNP37의 존재하에 6일 동안 배양했다. 제1일과 제7일에 뼈 길이를 측정했다. 다음에, 뼈를 파라핀 포매한 다음, 절편으로 만들어서 헤마톡실린과 에오신으로 염색하여 조직학적 변화와 세포 형태를 평가했다. Pro-Gly-CNP37("ProCNP38")에 의한 $FGFR3^{Y367C}$ 마우스에서 분리된 뼈 이식물의 처리는 뼈 성장의 증가와 성장판의 확장을 가져왔다(도 44). 6일 동안 부형제로 처리된 $FGFR3^{Y367C}$ 마우스의 대퇴골은 부형제로 처리된 야생형 대퇴골과 비교해서 길이 성장의 18% 결핍을 나타냈다. 6일 동안 1uM Pro-Gly-CNP37로 $FGFR3^{Y367C}$ 마우스의 대퇴골을 처리한 결과 성장 결핍이 11%로 감소되었는데, 즉 성장 결함이 약 40%까지 감소되었다.

[0933] [실시예 9]

[0934] CNP 변이체들의 생체외 혈청/혈장 안정성

[0935] 약동학(PK) 연구를 위한 준비로서 혈청 및/또는 혈장에서 CNP 변이체들의 안정성을 평가한다.

[0936] 간단히 말해서, 2% 트리클로로아세트산 침전 또는 1:3 혈청/아세토니트릴 침전에 의해서 혈청 또는 혈장 단백질을 제거하여 분석물질을 분리한다. 침전 혼합물을 5분 동안 14,000rpm에서 와동장치에서 교반하고, 상청액 일부를 취하여 물로 희석한 후에, 분석용으로 실란화된 오토샘플러 바이알에 옮겨 넣는다. 다음에, 혈청 추출물을 전자분무 이온화 질량분광기(ESI-MS)를 구비한 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로 분석한다. CNP 변이체에 특이적인 것으로 알려진 단일 질량(m/z)을 모니터하여 정량한다.

[0937] 먼저 분석 안정성 및 회수율을 결정한다. 분석(RP-HPLC 및 ESI-MS) 파라미터들을 바탕질 표준(침전 후 분석물질을 첨가한 혈청 추출물)의 분석을 통해 최적화한다. 최적화 후, 기지 농도의 혈청 샘플을 스파이크하고, 유사 농도로 제조된 바탕질 표준과 분석물질 반응을 비교하여 분석 회수율을 결정한다. 또한, 혈청 추출물 중의 분석물질 안정성을 측정하여 혈청 침전 후와 실제 분석 후에 유의한 손실이 일어나지 않는다는 것을 확인한다.

혈청 안정성에 대한 냉동 효과를 시험하기 위해서, 2 사이클의 냉동/해동 연구를 또한 수행한다. 이 연구에서는, 혈청 샘플에 CNP 변이체를 스파이크하여 분석한 후에 -20℃에서 하룻밤 냉동한다. 다음에, 샘플을 실온에서 해동하고 다시 분석한다. 이 과정을 두 번째 냉동/해동 사이클에서도 반복한다.

[0938] CNP 변이체를 10ug/mL의 농도로 혈청/혈장 샘플에 스파이크하여 CNP 변이체의 혈청 안정성을 측정한다. 샘플을 3시간 동안 37℃ 수조에 놓아둔다. 30분 간격으로 혈청에서 알리쿼트를 2번씩 취하여 분석한다. 분석물질의 빠른 손실이 증명된 경우(30분 이내에 50% 초과), 10분 시간 지점으로 연구를 반복할 수 있다.

[0939] 뮤린 혈장에서 CNP 변이체들의 안정성을 결정하기 위한 통상의 방법에서, CNP 변이체(약 2.5~5.0mg/mL 스톡 용액 10uL), 헤파린 뮤린 혈장(50uL, Bioreclamation, CD-1 Lith Hep 62231) 및 5M NaCL(10uL)의 혼합물을 37℃에서 5% 이산화탄소와 함께 0~5시간 동안 인큐베이션한 다음, 10x 프로테아제 억제제 칵테일(15uL, Sigma P2714)로 퀀칭했다. 추출을 위해, 150uL의 MeOH/0.1% FA를 반응 혼합물에 85uL까지 가하고, 결과의 혼합물을 1분 동안 와동장치에서 교반한 후, 15℃에서 15분 동안 원심분리한다. 상청액 75uL를 수성 0.1% FA 300uL에 가한다. 결과의 혼합물의 일부를 LC/MS 분석에 사용한다.

[0940] [실시예 10]

[0941] 래트 및 마우스에서 약동학 및 cGMP 생산

[0942] CNP22 및 특정 CNP 변이체의 약동학(PK) 프로파일과 CNP 펩티드의 1회 정맥내(i.v.) 또는 피하(s.c.) 투여 후 혈장 cGMP 농도의 시간에 따른 경과를 평가하기 위해서 정상적인 래트에서 연구를 수행했다. 혈장 CNP 면역반응성을 항-CNP 토끼 다클론성 항체를 사용하는 경쟁 방사성면역 분석(RIA)을 사용해서 측정했다. 혈장 cGMP 농도는 시판되는 키트(YAMASA 고리형 GMP 분석 키트, YAMASA Corporation)를 사용해서 RIA에 의해 측정했다.

[0943] 7~8주령의 정상적인 수컷 래트를 사용했다. 재조합 야생형 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)를 평가했다. 5% 만니톨 용액 중의 용액으로서 각 CNP 펩티드의 20nmol/kg 용량을 꼬리에 1회 정맥내 주사하거나, 또는 1% (w/v) 벤질알코올과 10%(w/v) 수크로오스를 함유하는 pH 4.0의 0.03mol/L 아세트산 버퍼 용액 중의 용액으로서 각 CNP 펩티드의 50nmol/kg 용량을 등에 1회 피하 주사했다.

[0944] 혈장 CNP 면역반응성을 항-CNP 토끼 다클론성 항체를 사용한 경쟁 RIA에 의해 측정했다. 표준 샘플과 QC 샘플을 제조했다. 표준 샘플, QC 샘플 및 분석 샘플을 50uL씩 50uL RIA 버퍼가 담긴 테스트 튜브에 각각 가했다. 희석된 항-CNP 토끼 다클론성 항체(100uL)를 튜브에 가했다. 모든 튜브를 4℃에서 하룻밤 보관했다. 125I-[Tyr0]-CNP22 용액(100uL) 및 토끼 IgG 용액(100uL)을 가하고, 약 4℃에서 하룻밤 방치했다. 10% 폴리에틸렌 글리콜을 함유하는 항-토끼 IgG 염소 혈청을 1mL를 가하고, 와동장치에서 교반해서 4℃에서 적어도 1시간 동안 방치한 후, 원심분리하여 불용성 분획을 침전시켰다. 상청액을 흡인한 후, 침전물의 방사선(감마선) 양을 감마 계수기로 측정했다. 각 샘플을 2번 측정했고, 평균을 측정값으로서 채택했다.

[0945] 정맥내 투약 후 5, 30, 60 및 90분에, 또는 피하 투약 후 5, 30, 60, 120 및 180분 후에 샘플의 혈장 cGMP 농도를 항-cGMP 단클론성 항체를 사용한 경쟁 RIA에 의해 측정했다. 표준 샘플을 제조했다. 분석 샘플(캘리브레이션 곡선용 표준 용액 또는 cGMP 측정용 희석 혈장 샘플) 100uL을 테스트 튜브로 옮겼다. 다음에, 항-cGMP 단클론성 항체 100uL 및 125I-표지된 숙시닐 cGMP 티로신 메틸 에스테르 용액 100uL를 튜브에 각각 가했다. 모든 튜브를 4℃에서 하룻밤 보관했다. 덱스트란 챠콜 용액 500uL를 가한 후, 튜브를 와동장치에서 교반하고, 10분 동안 얼음 위에 놓아두었다. 반응 혼합물을 원심분리하고, 각 샘플로부터 상청액 500uL를 새로운 테스트 튜브로 옮겨 넣었다. 상청액의 방사선(감마선) 양을 감마 계수기로 측정했다. 각 샘플을 2번 측정했고, 평균을 측정값으로서 채택했다.

[0946] 혈장 CNP 면역반응성을 약동학(PK) 분석에 이용했다. PK 분석을 WINNONLIN Professional(Pharsight Corporation)을 사용해서 수행했다. 정맥내 투여 후에 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 PK 프로파일을 제0시간째 농도(C0: 외삽, pmol/mL), 총 신체 청소율(CL_{ooo}: mL/min/kg), 정류 상태에서의 분포 용적($V_{\delta\tau\tau}$: mL/kg), 평균 체류 시간(MRT: 분) 및 반감기($T_{1/2}$: 분)와 같은 PK 파라미터들을 사용해서 계산했다. 피하 투여 후에 CNP 펩티드들의 PK 프로파일을 최대 혈장 농도($C_{\nu\alpha\omega}$: pmol/mL), $C_{\nu\alpha\omega}$ 도달 시간($T_{\nu\alpha\omega}$: 분), 평균 체류 시간(MRT: 분), 혈장 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC: pmol·min/mL) 및 반감기($T_{1/2}$: 분)와 같은 PK 파라미터들을 사용해서 계산했다.

[0947] 혈장 스파이크 회수율 실험에서는 RIA에 의해 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)가 유사하

게 검출되었다(데이터 나타내지 않음).

[0948] 상기 설명된 것들과 유사한 과정을 이용해서 마우스에서 CNP22와 그것의 변이체들의 PK 프로파일과 cGMP 생산을 자극하는 능력을 연구한다.

[0949] 3마리의 래트에 정맥내 투여 후에 CNP22, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R) (서열번호 36)의 PK 프로파일이 도 45에 도시된다. 도 45에 나타낸 대로, CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)는 CNP22보다 훨씬 더 긴 반감기와 훨씬 더 큰 생체이용률을 가졌다. 반감기 $T_{1/2}$(분)는 CNP22에서 1.42(±0.45), PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에서 22.3(±1.5) 그리고 CNP37에서 49.5(±28.0)였다. 곡선 아래 면적 AUC(pmol·분/mL)은 CNP22에서 320(±54), CNP37에서 1559(±568) 그리고 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에서 2084(±424)였다.

[0950] 3마리의 래트에 피하 투여 후에 3개 CNP 펩티드의 PK 프로파일이 도 46에 도시된다. CNP22와 비교해서, PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)은 훨씬 더 긴 반감기(78.1분(±16.4) 대 10.0분(±5.0))와 훨씬 더 큰 생체이용률(60%(±6%) 대 19%(±9%))을 가졌다.

[0951] 3마리의 래트에 3개의 CNP 펩티드의 정맥내 투여 후 혈장 cGMP 농도의 시간에 따른 경과가 도 47에 도시된다. 도 47은 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36) 및 CNP37의 정맥내 투여가 CNP22의 정맥내 투여보다 30, 60 및 90분에서 cGMP의 혈장 수준이 훨씬 더 높았음을 분명히 증명한다.

[0952] 3마리의 래트에 3개의 CNP 펩티드를 피하 투여한 후 혈장 cGMP 농도의 시간 프로파일이 도 48에 도시된다. 또한, PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36) 및 CNP37의 피하 투여는 CNP22의 피하 투여보다 실질적으로 더 높은 cGMP의 혈장 농도를 가져왔으며, CNP22와 비교한 차이는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)에서는 시간에 따라 증가했고, CNP37에서는 시간에 따라 감소했다.

[0953] 래트 연구들은 wtCNP22와 비교해서 CNP 변이체들인 CNP37와 PEO24-GANRR-CNP22 (K4R)(서열번호 36)가 실질적으로 더 긴 생체내 반감기와 실질적으로 더 큰 생체내 생체이용률을 가졌으며, 연장된 시간 기간 동안 생체내 cGMP 생성이 실질적으로 더 높은 수준으로 자극되었음을 시사한다. NEP 변성에 대한 CNP37 및 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)의 내성은 연장된 생체내 혈장 반감기와 상관되고, 이것은 차례로 연장된 생체내 NPR-B/cGMP 신호화와 상관된다. 이들 결과는 CNP22와 비교해서 본 발명의 CNP 변이체들이 정맥내 또는 피하 주사로 투여되었을 때(예를 들어, 하루 1회), 뼈-관련 질병 및 혈관 평활근 질병과 같은 CNP-반응성 상태 또는 질병들을 치료하는데 더 효과적일 수 있음을 나타낸다.

[0954] [실시예 11]

[0955] 마우스에서 약동학적 연구

[0956] 증가된 NEP 내성을 갖는 CNP 변이체를 결정하기 위해서, $FGFR3^{ach}$ 마우스에서의 효능 연구(실시예 13 참조)에서, CNP 변이체과 야생형 CNP22의 약동학적 특성을 비교하는 약동학(PK) 연구를 수행한다. $FGFR3^{ach}$ 마우스는 FVB 마우스의 배후에 1개의 트랜스젠을 함유하는 경증 연골무형성증을 가진 돌연변이 마우스 모델이다.

[0957] 야생형 CNP22와 그것의 변이체를 6주령 야생형 FVB 마우스에 1회 정맥내(i.v.) 용량으로 투여한다. 통상의 PK 연구를 wtCNP22를 가지고 수행했다. 6주령 FVB/N 마우스에 100nmol/kg의 단일 용량으로 wtCNP22를 정맥내 투여했다. CNP22의 평균 혈장 수준을 계산했으며, CNP22의 반감기는 0.76분 내지 1.03분인 것으로 추산되었다.

[0958] NEP 변성에 대해 더 큰 내성을 나타낸 CNP 변이체들은 시간에 따라 증가된 혈청 농도와 더 긴 생체내 반감기를 나타낼 것으로 예상된다.

[0959] [실시예 12]

[0960] 야생형 마우스에서 CNP 변이체들의 효능

[0961] 뼈 성장에 대한 CNP 변이체의 생체내 효과를 야생형 마우스에서 평가했다. 3주령 FVB 야생형 수컷 마우스에 5주 동안 부형제, G-CNP37(200nmol/kg) 또는 PEO12 -GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36)(200nmol/kg)를 매일 피하(sc) 주사했다. 체중을 적어도 1주에 1번 측정했다. 디지털 캘리퍼를 읽어서 적어도 1주에 1번 꼬리 길이를 측정하고, 치료 5주 후에 캘리퍼를 사용하여 신장(코~항문 길이), 뼈(경골, 대퇴골, 척골 및 상완골) 길이, 두개골(앞쪽 두개에서 뒤쪽 두개까지) 길이 및 5번 요추(LV5) 길이를 측정했다. X-레이를 기준 시점과 치료 5주 후에 찍었다.

[0962] G-CNP37을 사용한 야생형 마우스의 5주 치료는 유의한 체중 증가를 가져왔으며, 체중 증가는 제9일에 시작되는 것이 관찰되었다($p < 0.05$)(도 49). 또한, G-CNP37을 사용한 치료는 꼬리 길이를 유의하게 증가시켰으며, 이것은 치료 2주 후에 시작되었다($p < 0.01$)(도 50).

[0963] 표 10은 부형제로만 치료된 야생형 마우스의 값을 100%라고 했을 때 그와 비교해서 200nmol/kg의 G-CNP37 또는 PEO12-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36)가 5주 동안 매일 1번 피하 주사된 야생형 마우스에서 꼬리 길이, 신장(코~항문 길이), 두개골(앞쪽 두개에서 뒤쪽 두개까지) 길이, 뼈(대퇴골, 경골, 상완골 및 척골) 길이, 및 5번 요추(LV5) 길이의 변화 퍼센트를 나타낸다.

표 10

[0964]

	꼬리	코~항문	앞에서 뒤까지 (두개골)	대퇴골	경골	상완골	척골	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								

[0965] G-CNP37을 사용한 치료는 부형제 치료와 비교해서 꼬리 길이, 신장(코~항문 길이), 두개골 길이, 기부 뼈(대퇴골 및 상완골) 길이, 원위 뼈(경골) 길이 및 요추 길이(5번 요추)를 유의하게 증가시켰다.

[0966] 5주 동안 5nmol/kg, 20nmol/kg 또는 70nmol/kg의 저 용량의 Pro-Gly-CNP37을 매일 피하 투여한 경우에도 꼬리 길이, 신장(코~항문) 및 뼈 길이가 부형제와 비교해서 용량 의존적으로 증가했다. 표 11은 부형제로만 치료된 야생형 마우스의 값을 100%라고 했을 때 그와 비교해서 5nmol/kg, 20nmol/kg 또는 70nmol/kg의 Pro-Gly-CNP37이 5주 동안 매일 1번 피하 주사된 야생형 마우스에서 꼬리 길이, 신장(코~항문) 및 뼈(대퇴골, 경골, 상완골 및 척골) 길이의 변화 퍼센트를 나타낸다.

표 11

[0967]

	꼬리	코~항문	대퇴골	경골	상완골	척골
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						

[0968] 다른 연구에서는 Pro-Gly-CNP37의 다양한 투약 섭생을 9주 동안 투여한 후에 1주일 동안 회복시켰다. 야생형 FVB 마우스에 다음 일정에 따라 피하 투여했다:

[0969] (1) 9주 동안 부형제만 투여, 1주 회복;

[0970] (2) 1주 동안 매일 20nmol/kg Pro-Gly-CNP37 투여, 이어서 8주 동안 주 3회 투여, 1주 회복;

[0971] (3) 20nmol/kg Pro-Gly-CNP37 격주 투여; 또는

[0972] (4) 9주 동안 5nmol/kg Pro-Gly-CNP37 매일 투여, 1주 회복.

[0973] 꼬리 길이, 신장 및 뼈 길이의 성장 증가가 연구 종료 시점에서 모든 치료군(그룹 2, 3 및 4)에서 관찰되었다. 표 12는 부형제로만 치료된 야생형 마우스의 값을 100%라고 했을 때 그와 비교해서 상기 설명된 투약 섭생에 따라서 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")이 투여된 야생형 마우스에서 꼬리 길이, 신장(코~항문) 및 뼈(대퇴골, 경골, 상완골 및 척골) 길이의 변화 퍼센트를 나타낸다.

표 12

[0974]

	투약된 총 Pro-CNP38 (nmol/kg)	꼬리	코~항문	대퇴골	경골	상완부	척골
그룹 2	620	104.8%**	106.0%**	105.3%**	100.8%	102.5%	101.7%
그룹 3	700	106.7%**	106.5%**	104.1%**	102.5%**	102.6%*	102.8%*
그룹 4	350	104.9%**	105.1%**	107.3%**	102.7%**	102.3%**	103.6%**
**p<0.01, *p<0.05							

[0975] Pro-Gly-CNP37의 모든 투약 섭생은 측정된 축상 성장 및 주변부의 성장 파라미터들을 증가시켰으며, Pro-Gly-CNP37의 매일 투여는 낮은 총 용량 수준(그룹 4)에서도 적은 빈도로 투여된 그룹(그룹 2 및 3)과 비교해서 주변부(대퇴골, 경골, 상완골 및 척골) 성장을 촉진했다.

[0976] [실시예 13]

[0977] 경증 연골무형성증의 마우스 모델에서의 효과

[0978] 성장을 증진시키고 연골무형성증을 교정하는데 있어서 CNP 변이체들의 효능을 G380R 돌연변이를 갖는 사람 FGFR-3 유전자를 발현하는 트랜스젠 마우스 균주를 사용해서 경증 연골무형성증 마우스 모델에서 시험했다 ($FGFR3^{ach}$)(Wang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96(8):4455-4460 (1999); Naski et al., Development USA, 125:4977-4988 (1998); 미국특허 제6,265,632호 및 제6,136,040호).

[0979] 3주령의 $FGFR3^{ach}$ 마우스와 이들의 야생형 한배새끼를 마취한 다음, Faxitron으로 외측 전신 X-레이 영상을 찍고, 체중별로 다음의 치료군으로 무작위화했다(n = 8/그룹): (1) 야생형/부형제, (2) $FGFR3^{ach}$/부형제, (3) $FGFR3^{ach}$/CNP37 그리고 (4) $FGFR3^{ach}$/PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36). 마우스에 지정된 시험 품목(부형제 또는 200nmol/kg CNP 변이체)을 5주 동안 매일 1회 피하(sc) 투여했다. 종속군(n = 3)을 사용하여 제1일에 1회 피하 투여 후 각 시험 품목의 노출을 확인했다. 5주 동안 부형제를 매일 피하 주사한 야생형 수컷 FVB 마우스를 정상 성장에 대한 대조군으로 사용했다.

[0980] 기준 시점과 연구 종료 시점에서 X-레이 측정을 수행하여 두부 길이, 두개골 영역 및 외이도(EAM, 바깥쪽 귀에서 귀 중심까지 이어진 이도)의 변화를 측정했다. 체중과 꼬리 길이는 매주 적어도 1회 측정했으며, 디지털 캘리퍼를 사용해서 꼬리 길이를 측정했고, 신장(코~항문)은 치료 5주 후에 측정했다. 뼈(경골, 대퇴골, 척뼈 및 상완골) 길이는 부검시 디지털 캘리퍼를 사용하여 측정했다.

[0981] 제37일에 모든 마우스를 최종 마취하여 죽인 다음, Faxitron으로 동물의 전체 사진과 X-레이 영상을 찍었다. 좌측 및 우측 경골, 대퇴골, 상완골 및 척골을 수거해서 디지털 캘리퍼로 측정했다. 각 뼈의 좌측 부분은 조직학 검사를 위해 처리하고, 우측 부분은 보관용으로 급속 냉동시켰다. 뼈로부터 얻은 샘플을 사용해서 연골내 뼈 성장에 대한 CNP 변이체들의 효과를 평가했다.

[0982] 5주 동안 1일 1회 피하 주사 일정에 따라 CNP37으로 $FGFR3^{ach}$ 마우스를 치료한 결과, 뼈 길이(도 51), 꼬리 길이(도 52), 원위 뼈(척골 및 경골) 길이(도 53a 및 53b) 및 기부 뼈(상완골 및 대퇴골) 길이(도 54a 및 54b)가 유의하게 증가했다. 또한, CNP37을 사용한 치료는 신체 척추골의 확장을 통해서 두부 길이(도 56), 외이도 영역(도 57) 및 척추 길이(도 58)를 증가시켰다. 추가로, CNP37을 사용한 치료는 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 근경지(rhizomelia)(기부 팔다리 길이의 불균형)를 교정했는데, 즉 대퇴부:경골 비율에 의해 평가했을 때 기부 뼈들의 균형잡힌 성장이 회복되었다(도 55). 표 13에 부형제로만 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 값을 100%라고 했을 때 그와 비교해서 200nmol/kg의 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36) 또는 CNP37이 5주 동안 매일 1번 피하 주사된 $FGFR3^{ach}$ 마우스에서 꼬리 길이, 신장(코~항문) 및 뼈(대퇴골, 경골, 상완골 및 척골) 길이의 변화 퍼센트가 요약된다.

표 13

[0983]

	꼬리	코~항문	대퇴골	경골	상완골	척골
CNP37	115%**	109%**	112%**	107%**	105%*	106%**
CNP27-PEO24	100%	99%	100%	102%	100%	101%
**p<0.01, *p<0.05						

[0984] 이들 연구의 결과는 CNP37이 척추 및 긴 뼈의 성장을 자극하고, 경골에 비해 대퇴부의 길이를 우선적으로 증가시킴으로써 근경지 교정을 돕고, FGFR3^{ach} 마우스에서 두개안면 비율의 회복에 도움이 될 수 있음을 나타낸다. 이들 결과는 CNP37과 가능한 다른 CNP 변이체들이 연골무형성증의 증상을 교정하고, 뼈 성장에 결함이 있거나 뼈 성장 증가가 필요한 대상을 치료하는데 있어서 효과적일 수 있음을 시사한다.

[0985] [실시예 14]

[0986] 야생형 마우스와 연골무형성증 마우스에서 생체마커의 측정 및 면역원성의 평가

[0987] CNP 투여 후 생체마커의 측정

[0988] 뼈 성장 생체마커의 수준을 야생형 마우스와 연골무형성증(FGFR3^{ach}) 마우스에서 측정했다.

[0989] 트랜스젠 FVB FGFR3^{ach} 마우스(경증 연골무형성증의 마우스 모델)를 상기 설명된 대로 부형제(30mM 아세트산/아세트산염 버퍼, 1% 벤질알코올, 10% 수크로오스 pH 4.0), CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)를 각 CNP 화합물에 대해 200nmol/kg으로 5주 동안 매일 피하 주사하여 치료했다. 연구 동안 혈장과 혈청을 수집했다. 수집된 혈장은 분석시까지 -80℃에서 10x 프로테아제 억제제를 첨가해서 저장했다. 제36일에 주사 15분 후에 K2-ETDA 혈장 수집 튜브로부터 cGMP 수준을 측정했다. 연구 종료 시점에서(제37일) 말초 혈액 혈청으로부터 절단된 II형 콜라겐(연골-관련 생체마커), 오스테오칼신(뼈-관련 생체마커) 및 IgG(면역원성과 관련)의 단편들을 측정했다. cGMP는 시판되는 ELISA 키트(Cayman Chemical Co., Cat. No. 581021.1)로, 절단된 II형 콜라겐(Cartilaps)은 Immunodiagnostic Systems의 시판되는 키트(Cat. No. 3CAL4000)로, 오스테오칼신은 Biomedical Technologies Inc.(매사츄세츠 스토턴)의 시판되는 키트로 측정했다.

[0990] 도 59는 CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 FGFR3^{ach} 마우스에서 부형제와 비교해서 cGMP 혈장 수준이 증가한 것을 나타낸다. 도 60 및 61은 CNP37의 투여가 절단된 II형 콜라겐과 오스테오칼신의 혈청 수준의 최대 상승을 가져왔음을 보여준다. 이들 결과는 CNP 펩티드, 특히 CNP37의 FGFR3^{ach} 마우스에의 투여가 뼈 성장 마커들의 수준을 증가시켰음을 시사하며, 이는 CNP 펩티드로 치료된 FGFR3^{ach} 마우스에서 뼈 형성 및 성장이 증가된다는 것을 암시한다.

[0991] 야생형 마우스에서 생체마커들을 평가하기 위해서, 야생형 FVB 마우스를 부형제(30mM 아세트산/아세트산염 버퍼, 1% 벤질알코올, 10% 수크로오스, pH 4.0), 200nmol/kg G-CNP37, 200nmol/kg PEO12-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO12")(서열번호 36), 또는 20nmol/kg 또는 70 nmol/kg Pro-Gly-CNP37로 5주 동안 매일 피하 주사하여 치료했다. 연구 동안 혈장과 혈청을 수집했다. 수집된 혈장은 분석시까지 -80℃에서 10x 프로테아제 억제제를 첨가해서 저장했다. 제36일에 주사 15분 후에 K2-ETDA 혈장 수집 튜브로부터 cGMP 수준을 측정했다. 연구 종료 시점에서(제37일) 말초 혈액 혈청으로부터 절단된 II형 콜라겐, 뼈-특이적 알칼리성 포스파타제 및 IgG(면역원성과 관련)의 수준을 측정했다. 절단된 II형 콜라겐(Cartilaps) 및 cGMP는 상기 설명된 대로 측정했다. 뼈-특이적 알칼리성 포스파타제는 시판되는 키트(Cusabio, Cat. No. CSB-E11914m)를 사용하여 측정했다.

[0992] G-CNP37의 투여는 부형제와 비교해서 야생형 마우스에서 cGMP의 수준(도 62)과 특히 절단된 II형 콜라겐의 단편들의 수준(도 63)을 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$). G-CNP37의 투여로 인한 II형 콜라겐 단편들의 유의하게 높아진 수준은 연뼈 바탕질의 재편성을 시사하며, 이는 G-CNP37이 야생형 마우스의 뼈 성장에 있어서 새로운 뼈 형성을 자극했음을 암시한다.

[0993] Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")의 두 가지 용량, 즉 20 및 70nmol/kg은 모두 부형제로 치료된 야생형 마우스와 비

교해서 투여 15분 후에 혈장 cGMP 수준을 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$)(도 64). Pro-Gly-CNP37의 고 용량(70nmol/kg)의 투여 역시 부형제로 치료된 마우스와 비교해서 절단된 II형 콜라겐의 수준을 유의하게 증가시켰으며($p < 0.05$)(도 65), 이는 Pro-Gly-CNP37의 고 용량이 야생형 마우스에서 새로운 뼈 형성 전에 연골 바탕질의 재편성을 자극했음을 암시한다. 또한, Pro-Gly-CNP37의 고 용량(70nmol/kg)의 투여는 부형제로 치료된 마우스와 비교해서 뼈-특이적 알칼리성 포스파타제의 수준을 증가시켰는데($p < 0.05$)(도 66), 이는 Pro-Gly-CNP37의 고 용량이 야생형 마우스에서 뼈 재구축을 증가시켰음을 암시한다.

[0994] CNP 변이체들의 면역원성의 평가

[0995] CNP 변이체들은 펩티드 유도체이기 때문에, 이 펩티드들의 투여는 생체내에서 면역원성 반응을 유도할 수 있다. CNP 변이체의 연속 투여 후 면역반응이 발생했는지를 평가하기 위해서 혈청 항체 수준을 측정했다.

[0996] CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)("CNP27-PEO24")(서열번호 36)에 연골무형성증 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 5주 노출에 의해서 IgG 면역반응이 촉발되었는지를 평가하기 위해 IgG 분석을 수행했다. IgG는 마우스와 사람 혈청에서 가장 우세한 면역글로불린이며, 항원에 대한 2차 면역반응의 일부로서 생산된다. CNP 펩티드의 투여에 대한 IgG 반응을 다음과 같이 측정했다. 96-웰 플레이트를 BupH PBS 버퍼(Pierce/Thermo, Cat. No. 28372, 일리노이 록포드) 중의 100ng/mL CNP22, CNP37 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 코팅했다. 하룻밤 인큐베이션한 후, 플레이트를 Casein-PBS 차단 버퍼(Pierce/Thermo, Cat. No. 37528)로 실온에서 2시간 동안 300rpm에서 교반하면서 차단했다. 세척 버퍼(1x 0.05% Tween 첨가된 PBS)로 세척한 후, 말초 혈액으로부터 얻은 희석된 혈청 샘플(1:25 희석)을 플레이트에 가했다. 또한, 양성 대조군과 음성 대조군을 플레이트에 로딩했다. 양성 대조군은 1:1000 희석비로 항-CNP22 항체(Bachem 토끼 항-CNP22 IgG, Cat. No. T-4222)가 첨가된 1:25 희석 혈청이었다(6마리의 FVB 마우스로부터 모집한 혈청). 음성 대조군은 모집된 혈청을 희석한 것이었다. 2시간 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척하고, 차단 버퍼로 희석된 2차 항체를 웰에 가했다. 마우스 혈청 샘플의 경우, 항-마우스 IgG Fcγ(퍼옥시다제-콘쥬게이트 친화성-순수 염소 항-마우스 IgG, Fcγ 단편, Cat. No. 115-035-071, Jackson Immunoresearch, 펜실베니아 웨스트 그로브)를 1:10,000 희석비로 첨가했다. 양성 및 음성 대조군은 항-토끼 IgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. SC-2004, 캘리포니아 산타크루즈)를 차단 버퍼에 첨가했다. 300rpm에서 교반하면서 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척 버퍼로 세척했다. 100uL TMB(원-스텝 TMB, Pierce/Thermo, Cat. No. 34022)를 모든 웰에 가했다. 플레이트를 300rpm에서 교반하면서 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 2N 황산 100uL를 가해서 열량 반응을 중단시켰다. 플레이트를 450nm에서 판독하고(Spectramax, Molecular Devices, 캘리포니아 서니베일), SoftMax Pro 소프트웨어(Molecular Devices)를 사용하여 데이터를 분석했다.

[0997] CNP22 또는 PEO24-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36)로 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스의 혈청 샘플은 어떤 마우스에서도 양성 IgG 면역반응이 나타나지 않았다. 9마리의 CNP37로 치료된 $FGFR3^{ach}$ 마우스들 중 오직 1마리만이 약한 양성 IgG 반응을 나타냈다.

[0998] 또한, 혈청 IgG 수준의 증가에 의해서 측정했을 때, G-CNP37, PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36) 또는 Pro-Gly-CNP37이 투여된 야생형 마우스들의 면역원성 반응을 상기 설명된 대로 말초 혈액 혈청 샘플을 검사하여 평가했다. PEO12-GANRR-CNP22(K4R)(서열번호 36) 또는 Pro-Gly-CNP37(20 또는 70nmol/kg)로 치료된 야생형 마우스는 양성 IgG 면역반응을 나타내지 않았으며, G-CNP37이 투여된 6마리의 야생형 마우스들 중 오직 1마리만이 약한 양성 IgG 반응을 나타냈다.

[0999] 상이한 CNP 투약 섭생에서 생체마커의 측정

[1000] 야생형 FVB 마우스를 상이한 투약 섭생에 따라서 부형제(30mM 아세트산/아세트산염 버퍼, 1% 벤질알코올, 10% 수크로오스, pH 4.0) 또는 Pro-Gly-CNP37("Pro-CNP38")를 9주 동안 매일 피하(s.c.) 주사하여 치료했다. 그룹 1은 9주 동안 매일 피하 주사된 후 1주일의 치료 휴지기를 가진 부형제-치료된 마우스들을 포함했다. 그룹 2는 1주 동안 매일 1회 Pro-Gly-CNP37(20nmol/kg)으로 치료되고, 이어서 8주 동안 매주 3회 치료된 후, 1주일의 치료 휴지기를 가진 마우스들을 포함했다. 그룹 3은 격주로 매일 1회(1주, 3주, 5주, 7주 및 9주) Pro-Gly-CNP37(20nmol/kg)로 치료되고, 각 치료 주간 후에는 1주일의 치료 휴지기를 가진 마우스들을 포함했다. 그룹 4는 9주 동안 매일 1회 Pro-Gly-CNP37(5nmol/kg)로 치료된 후 1주일의 치료 휴지기를 가진 마우스들을 포함했다. 마지막으로, 그룹 5는 5주 동안 매일 1회 Pro-Gly-CNP37(5nmol/kg)로 치료되고, 치료 휴지기를 갖지 않은 마우스들을 포함했다. 마우스로부터 말초 혈액 혈청을 수집하고, 그로부터 절단된 II형 콜라겐, 총 알칼리성 포스파타제 및 총 항체 수준을 측정했다. 절단된 II형 콜라겐 수준은 상기 설명된 대로 측정했다. 주로 간과 뼈에

서의 총 알칼리성 포스파타제 수준을 측정해서 수의학적 진단용 실험실 검사 설비(Antech)를 보조했다.

[1001] 총 항체 분석은 잠재적 면역반응을 평가하기 위해 개발되었다. 총 항체 분석에 사용되는 플랫폼은 전기화학발광 분석(ECLA)이었다. ECLA 플랫폼은 비오틴-표지 약물(여기서는 비오틴-Pro-Gly-CNP37)과 루테늄-표지 약물(여기서는 Ru-Pro-Gly-CNP37)을 이용한다. 비오틴-표지된 약물은 전극을 함유하는 스트렙토아비딘-코팅 플레이트에 결합하고, 루테늄-표지된 약물은 루테늄이 전기화학적으로 자극될 수 있기 때문에 분석에서 검출 성분으로 기능한다. 약물-특이적 항체(여기서는 CNP-특이적 항체)는 비오틴-표지된 약물과 루테늄-표지된 약물에 결합해서 두 표지된 약물을 "연결한다". ECLA 플랫폼의 이점들 중에서, 항체의 어떤 이소타입(IgG, IgM 등)이 검출될 수 있고, ECLA 분석은 종-독립적이라는 것을 들 수 있다.

[1002] 총 항체 분석을 다음과 같이 수행했다. Pro-Gly-CNP37을 4:1 시험감염 비율로 비오틴으로 표지하고, 별도로 또한 Pro-Gly-CNP37을 10:1 시험감염 비율로 루테늄으로 표지했다. 두 개별적 표지화 반응을 글리신을 가해서 퀀칭하고, 두 반응물로부터 얻은 샘플을 PBS로 버퍼 교환했다. 5% 희석된 FVB 마우스 혈청에 저 농도 및 고 농도로 첨가된 시판되는 항-CNP22 항체(Bachem 토끼 항-CNP22 IgG, Cat. No. T-4222)를 사용해서 저 및 고 QC를 제조했다. 마우스 혈청 샘플을 분석용 희석액(PBS 중의 5% BSA, MSD Cat. No. R93AA-1)을 사용해서 5%까지 희석했다. 분석용 희석액에 비오틴-표지된 Pro-Gly-CNP37을 첨가하고, 분석용 희석액에 루테늄-표지된 Pro-Gly-CNP37을 첨가한 다음, 두 용액을 함께 조합함으로써 작업 용액을 제조했다. 저 및 고 QC를 25uL씩 대조군으로 플레이트 위에 로딩했다. 다음에, 샘플 25uL를 비-결합 96-웰 플레이트에 가하고, 이어서 모든 웰에 작업 용액 50uL를 가했다. 샘플 및 QC를 실온에서 2시간 동안 350rpm에서 교반하면서 작업 용액과 함께 인큐베이션했다. 한편, MSD 스트렙토아비딘 플레이트(MSD Cat. No. L13SA-1)를 실온에서 2시간 동안 350rpm에서 교반하면서 차단 버퍼(MSD Cat. No. R93AA-1)로 차단했다. 2시간 인큐베이션이 끝나면, MSD 스트렙토아비딘 플레이트를 세척하고, 샘플 또는 QC를 50uL씩 MSD 플레이트에 옮겨 넣었다. 다음에, 이 플레이트를 실온에서 1시간 동안 350rpm에서 교반하면서 인큐베이션했다. 1시간 인큐베이션이 끝나면, MSD 플레이트를 세척하고, 2x 판독 버퍼(MSD Cat. No. R92TC-2) 150uL를 플레이트에 가했다. 플레이트를 MSD PR400 기기에서 판독했다.

[1003] 5개의 마우스 그룹은 모두 절단된 II형 콜라겐에 대해 실질적으로 비슷한 수준을 나타냈다(도 67). 5주 동안 매일 1회 5nmol/kg Pro-Gly-CNP37로 그룹 5에 속한 마우스를 치료한 결과, 총 알칼리성 포스파타제 수준이 유의하게 증가했는데($p < 0.001$)(도 68), 이것은 뼈 재구축의 징표이다. Pro-Gly-CNP37로 치료된 4개 마우스 그룹에서 각각 얻은 혈청 샘플은 총 항체 분석에서 양성 항체 반응을 나타내지 않았다.

[1004] 어떤 이론과 결부되는 것은 아니지만, CNP-치료 마우스의 4개 그룹이 부형제-치료 마우스와 비교해서 절단된 II형 콜라겐 수준에 실질적으로 유의한 차이를 나타내지 않은 이유와 오직 그룹 5에 속한 CNP-치료 마우스들만이 부형제-치료 마우스와 비교해서 총 알칼리성 포스파타제 수준에 실질적으로 유의한 증가를 나타낸 이유에 관해서 설명이 가능하다. 본 연구에서는 부형제-치료된 마우스들도 역시 성장했기 때문에, 성장의 생체마커인 절단된 II형 콜라겐과 알칼리성 포스파타제가 부형제-치료 마우스에서도 생산되었다는 것이 가능하다. 이에 더하여, 그룹 1~4에 각각 속한 마우스들에 대해 치료하지 않은 1주일의 기간이 있었고, 이것이 그룹 1~3의 CNP-치료 마우스와 부형제-치료 마우스 사이에서 절단된 II형 콜라겐과 총 알칼리성 포스파타제 수준에 존재한 어떤 변화를 희석시켰을 것으로 추측된다. 그룹 5에 속한 CNP-치료 마우스의 경우에는 치료하지 않은 기간이 없었고, 이들 마우스는 부형제 치료된 마우스와 비교해서 유의하게($p < 0.001$) 높은 총 알칼리성 포스파타제 수준을 나타냈다.

[1005] [실시예 15]

[1006] 마우스에서 CNP 변이체들의 용량 반응

[1007] CNP 변이체들의 용량을 변화시킨 효과를 야생형 FVB 마우스에서 평가했다.

[1008] 용량 연구를 위해, 두 개별적 연구(S1 및 S2)에서, 10마리의 마우스 그룹에 Pro-Gly-wtCNP37("Pro-CNP38")을 20 및 70nmol/kg의 용량으로 36일 동안 매일 1회 피하 투여했다. 치료 과정 동안 꼬리 길이와 체중을 측정했다. 실험이 끝나면 동물을 죽여서 뼈 길이를 평가했다.

[1009] 부형제로 치료된 동물의 꼬리 길이는 제36일에 약 8cm였고, 20nmol/kg Pro-CNP38로 치료된 동물은 약 8.75cm의 꼬리 길이를 나타냈으며, 70nmol/kg Pro-CNP38로 치료된 동물은 약 9.5cm까지 꼬리 길이가 증가했다. 어떤 용량이든 Pro-CNP38의 투여는 대조군 치료된 동물과 비교해서 전체 신장의 유의한($p < 0.05$) 증가를 유도하며, 20nmol/kg Pro-CNP38에서는 성장 속도의 약 130% 증가, 그리고 70nmol/kg에서는 성장 속도의 약 160% 증가가 증명된다(도 69).

[1010] 또한, Pro-CNP38을 사용한 치료는 평가된 긴 뼈 대부분에서 뼈 길이를 유의하게 증가시켰을 뿐 아니라, 동물의 총 코~항문 길이(신장)도 증가시켰다. 도 14는 부형제로 치료된 동물과 비교해서 치료된 동물에서 뼈 길이의 상대적 증가 %를 나타낸다.

표 14

[1011]

Pro-CNP38	꼬리	코~항문	LV4-6	대퇴골	경골	상완골	척골
20 nmol/kg	8%*	7%*	10%*	7%*	4%*	3%*	3%
70 nmol/kg	16%*	13%*	13%*	10%*	7%*	4%*	5%*
상대적 증가 %, * p<0.05 ANNOVA (Dunnett식) 대 부형제							

[1012] 또한, Pro-CNP38을 상이한 용량으로 투여한 후에 뼈 무기질 밀도(BMD) 및 뼈 무기질 함량(BMC)를 평가했다. 결과(도 70)는 Pro-CNP38을 70nmol/kg으로 투여했을 때 뼈 무기질 밀도(도 70a)는 유의하게 감소하고 뼈 무기질 함량(도 70b)은 증가한 것으로 나타났으며, 이는 치료된 동물에서는 뼈 무기질화가 지연되기는 하지만, CNP 치료가 무기질화 과정 자체에 부정적인 영향을 미치는 것은 아니라는 것을 암시한다.

[1013] Pro-CNP38로 치료된 동물이나 부형제로 치료된 동물들에 있어서 기관 중량에는 유의한 변화가 없었다.

[1014] 마우스에서 용량 반응의 생체분석적 연구

[1015] Pro-CNP38을 용량을 변화시키면서 생체내 투여한 후 CNP 활성의 마커들을 측정하기 위해서 생체분석적 연구를 수행했다. 생체내 샘플로부터 혈장 cGMP 수준, II형 콜라겐의 혈청 수준 및 알칼리성 포스파타제의 혈청 수준을 분석했다. 야생형 마우스에 20 및 70nmol/kg Gly-wtCNP37("CNP38"), 20 및 70nmol/kg Pro-Gly-wtCNP37("Pro-CNP38"), 및 70 및 200nmol/kg GHKSEVAHRFK-wtCNP27("HSA-CNP27")(서열번호 144)를 36일 동안 매일 1회 피하 투여했다. 제36일째에 마지막 주사 후 15분 뒤에 혈장을 수집했고, 24시간 뒤에는 마우스를 죽였다. 마우스를 죽인 시점에서 말초 혈액 혈청을 수집해서 앞서 설명된 대로 생체마커 분석에 사용했다.

[1016] 도 71은 20nmol/kg CNP38과 70nmol/kg HSA-CNP27이 혈장 cGMP를 유의하게 증가시켰음을 나타내며($p<0.01$), 혈장 cGMP 수준은 각각 약 300pmol 및 400pmol까지 상승했다. 70nmol/kg CNP38의 투여는 cGMP를 약 500pmol까지 증가시켰고($p<0.01$), 70nmol/kg Pro-CNP38의 투여는 cGMP를 약 575pmol까지 증가시켰다($p<0.001$). 200 nmol/kg HSA-CNP27의 투여는 cGMP를 약 675pmol까지 증가시켰다($p<0.001$).

[1017] CNP 변이체들은 또한 절단된 II형 콜라겐의 혈청 수준을 유의하게 증가시켰다(도 72). CNP38은 20nmol/kg에서 콜라겐을 약 9pg/ml까지 증가시켰고($p<0.05$), CNP38은 70nmol/kg에서 콜라겐을 약 8pg/ml까지 증가시켰고($p<0.05$), Pro-CNP38은 20nmol/kg에서 콜라겐은 약 12pg/ml까지 증가시켰고($p<0.05$), Pro-CNP38은 70nmol/kg에서 콜라겐을 약 16pg/ml까지 증가시켰고($p<0.05$), HSA-CNP27은 70nmol/kg에서 콜라겐을 약 10pg/ml까지 증가시켰고, HSA-CNP27은 200nmol/kg에서 콜라겐을 약 10pg/ml까지 증가시켰다($p<0.05$).

[1018] 혈청 알칼리성 포스파타제(AP)의 수준도 CNP 변이체들의 투여 후에 역시 증가되었다(도 73). CNP38은 20nmol/kg에서 AP를 약 130IU/L까지 증가시켰고, CNP38은 70nmol/kg에서 AP를 약 160IU/L까지 증가시켰고($p<0.001$), Pro-CNP38은 20nmol/kg에서 AP를 약 155IU/L까지 증가시켰고($p<0.001$), Pro-CNP38은 70nmol/kg에서 AP를 약 180IU/L까지 증가시켰고($p<0.001$), HSA-CNP27은 70nmol/kg에서 AP를 약 120IU/L까지 증가시켰고, HSA-CNP27은 200nmol/kg에서 AP를 약 140IU/L($p<0.01$)까지 증가시켰다. 표 15는 총 AP 중 뼈 특이적인 AP의 퍼센트를 나타낸다.

표 15

[1019]

	총 AP IU/L	뼈-특이적 AP IU/L	총 Alk Phos 중 %
부형제	109.8	24.7	22.5
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

[1020] 항-CNP 항체 분석은 HSA-CNP27만이 마우스에서 IgG 항체 반응을 도출했음을 나타냈다.

[1021] 상기 결과는 CNP 변이체들의 투여가 혈청에서 II형 콜라겐과 알칼리성 포스파타제의 농도를 증가시킨다는 것을 예시하며, 이는 CNP가 뼈 성장 증가와 관련된 인자들을 증가시킨다는 것을 시사하는 한편, 20nmol/kg 정도의 낮은 용량으로 CNP 변이체를 투여하는 것이 생체내에서 뼈 성장을 증가시키는데 효과적임을 암시한다.

[1022] 상이한 투약 섭생 후의 cGMP 반응

[1023] 8~10주령 야생형 CD-1 마우스에 Pro-Gly-wtCNP37("Pro-CNP38")를 투여한 후 상이한 시간들에서 생체분석적 분석을 수행했다(n = 3, 치료군당). Pro-CNP38을 200nmol/kg의 용량으로 1회 피하 투여하고, 주사 후 15분, 3시간, 1일, 2일 및 3일 뒤에 혈장, 골단, 피질성(골수 제거된) 뼈, 폐 및 뇌에서 cGMP의 수준을 측정했다. K2EDTA에 혈액을 수집했다. 경골과 대퇴골의 골단 및 피질성 뼈, 이도, 뇌, 신장 및 폐를 수거해서 끓는 물에 5분 동안 넣어둔 후, -70℃에서 냉동시켰다. 혈장과 조직을 모두 cGMP에 대해 분석했다(Cayman Chemical 고리형 GMP ELISA 키트).

[1024] 결과는 혈장(약 1300pmol/mL)과 골단(약 2.5pmol/mL/mg)에서 cGMP 수준이 주사 15분 후에 증가했음을 나타냈다. 3시간까지 혈장 수준은 대략 대조군 수준까지 감소했고, 골단에서의 수준은 주사 15분 후의 cGMP 수준보다 약 3배 더 낮았지만, 대조군 수준보다는 높았다. 피질성 뼈의 수준은 제15분에 대략 0.5pmol/mL/mg까지 증가하여 3시간째에도 이 수준을 유지했다. 모든 시간 지점에서의 cGMP 수준은 주사 1일 후에는 대조군 수준으로 되돌아갔다. 어떤 시간 지점에서도 폐나 뇌에서는 cGMP가 전혀 또는 거의 검출되지 않았다.

[1025] 또한, Pro-CNP38을 여러 번 주사한 마우스에서 cGMP 수준을 측정했다. 마우스 그룹(n = 3)에는 다음과 같이 Pro-CNP38을 제공했다: 20nmol/kg 단일 용량, 피하; 200nmol/kg 단일 용량, 피하; 20nmol/kg, 제0일 및 제1일, 피하; 200nmol/kg, 제0일 및 제1일, 피하; 20nmol/kg, 제0일 및 제3일, 피하; 200nmol/kg, 제0일 및 제3일, 피하. Pro-CNP38의 최종 투약 후 15분 뒤에 마우스를 죽여서 cGMP의 혈장 수준을 분석했다. 상이한 투약 섭생으로 인한 혈장 cGMP 신호의 조정은 나타나지 않았다. 또한, 연골에서의 cGMP 반응을 조사했다.

[1026] NPR-B 수용체의 잠재적 감작의 평가

[1027] 조직학적 분석은 CNP가 200nmol/kg으로 매일 투여되었을 때 동물의 성장판에 축적된다는 것을 증가된 CNP 면역반응성에 기초하여 나타낸다. 성장판에서 보이는 이런 축적이나 CNP 수용체를 매일 자극하는 것은 CNP 수용체를 감작시킬 수 있다.

[1028] 여러 번의 투약이 생체외에서 NPR-B 수용체의 감작을 일으키는지를 결정하기 위해서, 정상 사람 관절 연골세포를 Pro-Gly-wtCNP37("Pro-CNP38")과 함께 시간을 변화시키면서 배양하고, cGMP 분비를 측정했다.

[1029] 관절 연골로부터 분리된 1차 정상 사람 연골세포를 공급자(Lonza)가 권장한 대로 배양했다. 60~80% 합류점에서 연골세포를 1uM Pro-CNP38로 2번 처리했는데, 이때 치료 간격을 점점 넓히면서 시험했다(제0시간에서 최초 처리, 다음에 최초 처리 후 15분, 30분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간째에 처리). 다음 실험에서, 처리는 2번 적용되었는데, 치료 간격을 점점 넓히면서 처리되거나(제0시간에서 최초 처리, 다음에 최초 처리 후 6시간, 16시간, 24시간, 48시간째에 처리), 또는 2차 치료와 병행하여 오직 1번만 처리되었다(제6시간, 제16시간, 제24시간 및 제48시간에 첫 반응). 처리는 15분 동안만 적용되거나(급성 처리), 또는 실험기간 내내 적용되었다(만성 처리, CNP가 배지의 좌측에 있을 때). 세포 용해물과 컨디셔닝 배지를 수집하여 총 cGMP 분비에 대해 분석했다(Molecular Devices ELISA).

[1030] 단기 실험에서, 세포를 15분 동안 2번 1uM Gly-wtCNP37("CNP38")(급성 처리)로 자극하거나, 또는 배양하는 내내 CNP38로 2번(만성 처리) 자극했다. 치료 간격은 15분, 30분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간 및 6시간이었다. 최고 cGMP 자극은 세포를 오직 한번 처리했을 때, 실험의 마지막 시간 지점에 얻어졌다(6시간; 급성 실험에서 > 0.1pmol/웰, 만성 실험에서 > 0.2pmol/웰). 급성 실험에서, 세포를 2번 처리했을 때, 세포를 제0시간에 처리하고, 다음에 제15분에 다시 처리한 경우에는 반응이 0.1pmol/웰까지 감소한다. 급성 실험에서, 세포를 2번 처리했을 때, 세포를 제0시간에 처리하고, 30분, 60분, 2시간, 3시간 및 4시간째에 다시 처리한 경우에는 반응이 대략 0.5pmol/웰까지 감소한다. 만성 실험에서, 세포를 2번 처리했을 때, 세포를 제0시간과 제15분에 처리한 경우에는 반응이 대략 0.16pmol/웰까지 감소한다. 만성 실험에서, 세포를 2번 처리했을 때, 세포를 제0시간에 처리하고, 30분, 60분 또는 2시간째에 다시 처리한 경우에는 반응이 대략 0.6pmol/웰까지 감소한다. 만성 실험에서, 세포를 2번 처리했을 때, 세포를 제0시간에 처리하고, 2시간, 4시간 또는 6시간째에 다시 처리한 경우에는

반응이 대략 0.5pmol/웰 미만까지 감소한다.

[1031] 또한 장기 연구를 수행했다. 급성 처리의 경우, 1uM의 CNP38을 상기 설명된 대로 세포 배양물에 가했다. 만성 처리의 경우, 1uM의 CNP38을 상기 설명된 대로 실험 전 기간 동안 세포 배양물에 가했다. 결과는 매일 반복된 CNP 투여 후 NPR-B 수용체가 생체외 감작될 수 있고, 투약 간격은 48시간이 CNP가 1차 투약 후 제거될 경우에는 CNP38에 대한 최대 NPR-B 반응의 60%까지 회복하는데, 그리고 CNP가 시험기간 내내 인큐베이션되는 경우에는 40% 미만까지 회복하는데 충분하다는 것을 나타낸다(도 74).

[1032] CNP 변이체를 사용한 치료가 생체내에서 NPR-B 수용체의 감작을 일으키는지를 평가하기 위해서 야생형 마우스에서 실험을 수행했다. 8~10주령 CD-1 수컷 마우스에 적합한 치료일들에 200nmol/kg으로 부형제 대조군 또는 Pro-Gly-wtCNP37("Pro-CNP38")을 피하 주사했다. 마우스에는 8일까지 매일 Pro-CNP38을 주사하거나, 또는 연구 제1일, 제1일과 제2일, 또는 제1일과 제3일에 Pro-CNP38을 주사했다. 최종 주사 후 15분 뒤에, 마우스(n = 3, 치료군당)를 깊이 마취시키고, 가슴을 열어 대동맥 캐뉼라를 삽입해서 방혈시켰다. 대동맥 캐뉼라에 PBS를 흘려 보내서 순환 혈액을 제거했다. 신장, 우측 경골, 우측 대퇴골 및 좌측 대퇴골을 수거해서 5분 동안 물에서 끓이고, 및/또는 액체 질소에 급속 냉동시키고, cGMP 분석시까지 드라이아이스나 -70℃ 냉동고에 저장했다. 연골에서의 cGMP 생산을 추산하기 위해서, 원위 대퇴골 및/또는 기부 경골을 절개하여 칭량하고, Covaris Cryoprep CP02를 사용해서 분쇄했다. 분말 샘플을 5% 과염소산 중에서 Covaris E210 초음파 처리장치를 사용하여 균질화한 후에 60% KOH로 중화시켰다. 다음에, 샘플을 4℃에서 5분 동안 10,000rpm에서 원심분리해서 상청액을 cGMP 분석에 사용했다(고리형 GMP 효소면역분석 키트, Cayman, 미시간). 추가로, 좌측 경골을 수거해서 10% 정규 완충 포르말린에 고정하여 추가의 면역조직화학 분석을 위해 보관해 두었다.

[1033] 도 75a는 1, 4, 6, 7 및 8일 동안 200nmol/kg의 Pro-CNP38로 야생형 마우스를 매일 반복 치료했을 때 cGMP 반응의 감작이 일어나지 않았음을 나타낸다. 반면에, 4일 동안 매일 치료한 후에는 cGMP 반응의 증강효과가 관찰되었다. 또한, 매일 치료한 경우 8일째에는 cGMP 반응의 평탄역에 도달했다. 이 결과는 8일까지는 200nmol/kg의 Pro-CNP38로 야생형 마우스를 매일 치료하는 것이 cGMP 반응의 감작을 일으키지 않는다는 것을 나타낸다.

[1034] 또한, Pro-CNP38로 야생형 마우스를 치료한 후 원위 대퇴부 연골에서 cGMP 반응의 반응역학을 조사했다. 2일 동안 하루 1회 마우스를 치료한 경우 단일 치료에 대한 cGMP 반응과 비교해서 Pro-CNP38에 대한 cGMP 반응이 증강되었다(도 75b). 제1일과 제2일에 마우스를 치료했을 때는 아니지만, 제1일과 제3일에 마우스를 치료했을 때는 두 번째 치료(제3일) 후 cGMP 반응이 단 하루 1회 치료한 후에 관찰된 cGMP 반응과 실질적으로 유사했다(도 75b). 이 결과는 매일 투약하는 것이 이 마우스 연구에서 Pro-CNP38에 대한 cGMP 반응을 증강시키는데 유익하다는 것을 시사한다.

[1035] 상이한 조직들에서 NPR-B의 활성화

[1036] CNP 변이체에 의한 상이한 조직들에서 NPR-B의 잠재적 활성화를 평가하기 위해서, 야생형 수컷 CD-1 마우스에 200nmol/kg Gly-CNP37을 주사하고, 상이한 시간 지점들에서 특정 조직에서 cGMP 반응을 측정했다. 각 치료군에 2마리의 마우스를 사용했다. 각 마우스에는 Gly-CNP37 또는 부형제 대조군을 1회 피하 주사했다. 주사 후 15, 30 또는 60분 또는 3시간 뒤에 마우스를 마취시키고, 가슴을 열어 대동맥 캐뉼라를 삽입해서 방혈시켰다. 대동맥 캐뉼라에 PBS를 흘려 보내서 순환 혈액을 제거했다. 심장, 간, 폐, 신장, 이도, 대동맥 및 뇌를 수거했다. 모든 조직을 5분 동안 물에서 끓이고, 미세하게 절개하고(대퇴부 피질의 골수를 PBS로 씻어내는 것을 포함한다), 칭량하고, 액체 질소에서 냉각시켜서, BioPulverizer에서 분쇄했다. 결과의 분말 샘플을 미리 냉각한 6% 과염소산 중에서 Polytron으로 균질화한 후에 60% KOH로 중화시켰다. 다음에, 샘플을 4℃에서 5분 동안 10,000rpm에서 원심분리해서 상청액을 cGMP 분석에 사용했다(고리형 GMP 효소면역분석 키트, Cayman Chemical Company, 미시간 앤아버). 결과를 조직 중량에 맞춰 정규화했다.

[1037] Gly-CNP37(도 76의 "CNP")를 사용한 치료에 반응한 cGMP의 분비가 원위 대퇴뼈(연골 및 뼈), 대퇴부 피질(뼈), 이도(연골), 및 신장에서 검출될 수 있었다(도 76a~d). 이들 조직에서 최대 cGMP 반응은 치료 15분 후에 관찰되었다. 간, 심장, 폐 및 뇌 조직은 연구된 시간 지점들에서 부형제 대조군에 비하여 Gly-CNP37에 반응한 인지가능한 cGMP 분비를 나타내지 않았다(도 76e~h). 이 결과는 200nmol/kg의 Gly-CNP37을 사용한 치료가 연골, 뼈 및 신장 조직에서 cGMP 분비를 자극했음을 시사한다.

[1038] [실시예 16]

[1039] 원숭이에서 CNP 변이체들의 용량 반응

[1040] 뼈 성장 및 뼈 성장-관련 생체마커의 수준에 대한 CNP 변이체 Pro-Gly-CNP37의 효과를 시노몰거스(cynomolgus)

원숭이에서 평가한다. 8마리의 정상 청년 시노몰거스 원숭이(진행중인 연구 시작 시점에서 약 2.5세)에 10 또는 36㎍/kg/일의 Pro-Gly-CNP37을 매일 피하 주사한다(n = 용량 그룹당 4마리). 4마리의 원숭이에는 대조군으로서 부형제를 투여한다. 전체 치료기간은 6개월이다. 디지털 X-레이 및 자기공명영상에 의해 그리고 팔다리와 신장을 외측 측정해서 성장판 확장 및 뼈 성장을 여러 방식으로 측정한다. 혈액 및 뇨 샘플을 주기적으로 수집하여 임상병리검사를 수행하고, Pro-Gly-CNP37 및 생체마커의 수준을 측정한다. 연구 종료 후, 육안 병리검사를 수행하고, 조직 샘플의 조직검사를 수행해서 효능 및 안전성을 평가한다.

[1041] 진행중인 연구에서 지금까지 얻어진 데이터는 Pro-Gly-CNP37의 두 용량이 모두 디지털 X-레이에서 증가된 성장판 너비(도 77), 디지털 X-레이에서 증가된 우측 및 좌측 경골 길이(도 78a 및 78b), 외측 측정에서 증가된 다리 길이(도 79), 외측 측정에서 증가된 팔 길이(도 80), 외측 측정에서 증가된 신장(도 81) 그리고 뼈 형성의 생체마커인 알칼리성 포스파타제의 증가된 혈청 수준(도 82)을 보인다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 Pro-Gly-CNP37이 혈역학적으로 허용되는 용량에서 정상 청년 시노몰거스 원숭이에서 뼈 성장을 자극할 수 있음을 증명한다.

[1042] [실시예 17]

[1043] 마우스에서 심혈관계에 대한 CNP 변이체의 효과

[1044] CNP와 같은 나트륨이뇨 펩티드는 심혈관계에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. Wang 등(Eur J Heart Fail. 9:548-57 (2007))은 CNP가 래트에서 심근경색 후 심근허혈/재관류 손상을 방지하고 심장 재구축을 개선하는데 있어서 심장보호 효과를 갖는 것으로 나타났다고 설명한다. Wang은 CNP를 과발현하는 마우스에서 심근경색으로 인한 심장 비대증의 발생이 감소했음을 증명했다. 추가로, CNP는 내피-독립적 혈관확장을 야기하는 것으로 나타났으며(M. Honing *et al.*, Hypertension, 37:1179-1183 (2001)), 따라서 생체내 연구에서 혈압을 일시적으로 감소시킬 수 있다.

[1045] 심혈관계에 대한 CNP 변이체의 효과를 평가하기 위해서, 마취된 야생형 FVB 마우스에서 변이체의 피하 주사 후 혈압과 심박수를 연구한다.

[1046] 심혈관 활성의 넓은 용량 범위를 정하기 위한 파일럿 연구 후, 용량 반응 연구를 수행하여 각 CNP 변이체의 상이한 세 용량 수준의 효과를 시험한다. 8주령 수컷 FVB 마우스 3마리가 각 치료군에 포함된다. 마취된 마우스에 용량을 피하 투여하고, 수축기, 확장기 및 평균 동맥압(MAP)과 심박수를 이식된 동맥내 압력 변환기를 통해 모니터한다.

[1047] [실시예 18]

[1048] CNP 변이체의 제제

[1049] 상이한 pH(pH 3, 4, 5, 6, 7 및 8) 및 온도(5℃, 25℃ 및 40℃)에서 시간에 따른 CNP 변이체 Gly-wtCNP37("CNP38")의 안정성을 평가하기 위해서 CNP 예비제제 연구를 수행했다. 이 연구에서 CNP38은 다른 pH에서보다 pH 4~6에서 더 큰 안정성을 나타냈다. CNP38은 pH 4~6에서는 5℃에서 안정했으며, 15주 후까지 CNP38의 약 95% 이상이 잔류했다. 온도를 25℃까지 상승시켰을 때, pH 4에서는 15주 후에 CNP38의 약 85%가 잔류했고, pH 5에서는 15주 후에 약 85% 그리고 pH 6에서는 15주 후에 약 80%가 잔류했다. 온도를 40℃까지 상승시켰을 때, pH 4에서는 15주 후에 CNP38의 약 55~60%가 잔류했고, pH 5에서는 15주 후에 약 65% 그리고 pH 6에서는 15주 후에 약 40%가 잔류했다. 도 83은 5℃, 25℃ 및 40℃에서 pH 3~8에서 관찰된 pH에 대한 위(pseudo)-1차 변성 속도상수($K_{o\beta\tau}$)의 플롯을 도시한다. 예비제제 연구에서 CNP38에 대한 안정성 데이터는 약 4 내지 약 6의 범위에 있는 pH를 가진 CNP 제제를 제안한다. 산성 pH(예를 들어, 약 pH 6 이하)는, 예를 들어 아스파라긴 및/또는 글루타민 잔기9들)의 탈아미드화, 아스파르트산 잔기(들)의 이성질화, 또는 다른 경로에 의한 CNP 변이체의 변성을 최소화하거나 방지함으로써 CNP 변이체의 안정성을 촉진할 수 있다.

[1050] CNP 변이체는, 예를 들어 뼈 성장 이상을 가진 대상대상대상 위해 제약학적 담체 중에 제제화될 수 있다. 어떤 구체예에서, CNP 변이체의 액체 제제는 표 16에 나타낸 성분들과 이들의 양 또는 농도의 어떤 조합에 따라서 제제화된다.

표 16

성분 분류	성분	농도 범위
활성 성분	CNP 변이체	10 mg/mL ± 9.9 mg/mL
완충제	아세트산/아세트산염	10 mM ± 5 mM, 또는 pH 5 ± 1
완충제	시트르산/시트르산염	10 mM ± 5 mM, 또는 pH 5 ± 1
등장성조절제	NaCl	140 mM ± 20 mM
등장성조절제	수크로오스	10% ± 5%
보존제	m-크레졸	0.4% ± 0.1% 또는 0.2%
보존제/흡착방지제	벤질알코올	1.5% ± 0.5%
안정제	글리세린(글리세롤)	5% ~ 100% (순수)[1]
안정제	메티오닌	0.01% ~ 0.2%
안정제	아스코르브산/아스코르베이트 염	0.1% ~ 1%
안정제	티오글리세롤	0.1% ~ 1%
흡착방지제	폴리소르베이트 20 폴리소르베이트 80 벤질알코올	0.001% ~ 0.5% 0.001% ~ 0.5% 0.5% ~ 1.5%
[1]글리세린은 CNP 변이체의 물에 의한 가수분해, 탈아미드화, 이성질화 또는 절단을 최소화하거나 방지하기 위해 사용된다. 동결건조 제제의 경우, 4~6% 또는 6~20% 만니톨 또는 수크로오스가 NaCl을 대신할 수 있다.		

[1051]

[1052] 특정 구체예에서, CNP 변이체의 동결건조 제제는 표 17에 나타낸 성분들과 이들의 양 또는 농도의 어떤 조합에 따라서 제제화된 제제로부터 제조된다.

표 17

성분 분류	성분	농도 범위
활성 성분	CNP 변이체	10 mg/mL ± 9.9 mg/mL
완충제	아세트산/아세트산염	10 mM ± 5 mM, 또는 pH 5 ± 1
완충제	시트르산/시트르산염	10 mM ± 5 mM, 또는 pH 5 ± 1
등장성조절제/증량제	소르비톨	5% ± 3%
등장성조절제/증량제	만니톨	5% ± 3%
등장성조절제/증량제	수크로오스	10% ± 5%
보존제	m-크레졸	0.4% ± 0.2%
보존제/흡착방지제	벤질알코올	1.5% ± 0.5%
안정제	글리세린(글리세롤)	5% ~ 100% (순수)[1]
안정제	메티오닌	0.01% ~ 0.2%
안정제	아스코르브산/아스코르베이트 염	0.1% ~ 1%
안정제	티오글리세롤	0.1% ~ 1%
흡착방지제	폴리소르베이트 20 폴리소르베이트 80 벤질알코올	0.001% ~ 0.5% 0.001% ~ 0.5% 0.5% ~ 1.5%
[1]글리세린은 CNP 변이체의 물에 의한 가수분해, 탈아미드화, 이성질화 또는 절단을 최소화하거나 방지하기 위해 사용된다.		

[1053]

[1054] 특정 구체예에서, CNP 변이체를 포함한 제제는 약 3~7, 또는 약 3~6, 또는 약 3.5~6.5, 또는 약 4~6, 또는 약 4~5, 또는 약 4.5~5.5의 pH를 가진다. 어떤 구체예에서, pH 4~5.5의 경우 적합한 완충제는 아세트산/아세트산염(예를 들어, 아세트산 나트륨)이고, pH 5.5~6의 경우 적합한 완충제는 시트르산/시트르산염이다. 또한, 시트르산/시트르산염(예를 들어, 시트르산 나트륨)은 pH 3~6 또는 pH 4~6의 범위에도 적합한 완충제이다. 특정 구체예에서, 완충제는 제제 중에 약 2~50mM, 또는 약 2~40mM, 또는 약 2~30mM, 또는 약 5~30mM, 또는 약 2~20mM, 또는 약 5~20mM, 또는 약 5~15mM의 농도로 존재한다.

[1055] CNP 변이체의 탈아미드화를 최소화하거나 피하기 위해서, 변이체는 글리세린, 에탄올 및 프로필렌 글리콜과 같

은 제약학적으로 허용되는 유기 공용매 중에 제제화될 수 있다. 탈아미드화는 가수분해에 의해서 일어나기 때문에, 물을 유기 공용매로 치환하여 CNP 변이체과 물의 접촉을 최소화한다. 유기-수성 용매 시스템에서 하나 이상의 유기 용매의 농도는, 예를 들어 약 10% 내지 약 99%, 또는 물이 사용되지 않은 경우에는 약 100%일 수 있다.

[1056] 또한, CNP 변이체의 탈아미드화를 최소화하거나 피하기 위해서, 동결건조에 의해서 제제로부터 물이 제거될 수 있다. 어떤 구체예에서, 동결건조 제제는 다음의 성분들의 어떤 조합을 함유한다:

[1057] 버퍼: 아세트산 나트륨 및 아세트산, 또는 시트르산 나트륨 및 시트르산;

[1058] 등장성/증량제: 만니톨(예를 들어, 3~10%, 2~8% 또는 4~6%); 수크오로스(예를 들어, 6~20%, 5~15% 또는 8~12%);

[1059] 항산화제: 메티오닌 및/또는 아스코르브산, 각 항산화제 대 CNP 변이체의 몰비는 약 0.1:1 내지 약 1:1, 또는 약 0.5:1 내지 약 5:1, 또는 약 1:1 내지 약 15:1, 또는 약 1:1 내지 약 10:1, 또는 약 3:1 내지 약 10:1.

[1060] 또한, 탈아미드화는 CNP 조성물(예를 들어, 액체 제제 또는 동결건조 제조)을 저온, 예를 들어 약 5℃, 0℃, -10℃, -20℃, -30℃, -40℃, -50℃, -60℃, -70℃, -80℃, -90℃ 또는 -100℃에서 저장함으로써 최소화되거나 방지될 수 있다.

[1061] CNP 변이체에서 산화성 잔기(예를 들어, 메티오닌)의 산화를 최소화하거나 피하기 위해서, 변이체는 하나 이상의 항산화제와 함께 제제화될 수 있다. 통상의 항산화제는, 제한은 아니지만, 메티오닌, 아스코르브산 및 티오글리세롤을 포함한다. 예를 들어, 메티오닌 잔기의 산화는 또한 질소나 아르곤으로 액체 배지(액체 제제일 경우)로부터 산소를 제거하고, 및/또는 질소나 아르곤으로 용기 또는 포장으로부터 산소를 제거함으로써 최소화되거나 방지될 수 있다.

[1062] 어떤 구체예에서, 흡착(예를 들어, 플라스틱 또는 유리에 CNP 변이체의 흡착)을 최소화하거나 방지하기 위해서, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 또는 벤질알코올, 또는 이들의 조합이 CNP 제제에 첨가된다. 특정 구체예에서, 흡착방지제(들)은 각각 약 0.001% 내지 약 0.5%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.5%, 또는 약 0.1% 내지 약 1%, 또는 약 0.5% 내지 약 1%, 또는 약 0.5% 내지 약 1.5%, 또는 약 0.5% 내지 약 2%, 또는 약 1% 내지 약 2%의 농도로 존재한다. 제제 중에 흡착방지제(들)의 통상의 범위(들)는, 제한은 아니지만, 폴리소르베이트 20 약 0.001% 내지 약 0.5%, 폴리소르베이트 80 약 0.001% 내지 약 0.5%, 및/또는 벤질알코올 약 0.5% 내지 약 1.5%를 포함한다.

[1063] 어떤 구체예에서, 액체 CNP 제제는 (1) 약 30mM±5mM 또는 10mM 완충제의 농도와 약 4±0.5 또는 1의 pH를 갖는 아세트산/아세트산염(예를 들어, 아세트산 나트륨) 버퍼, (2) 약 1%±0.5% 농도의 벤질알코올(예를 들어, 보존제 및/또는 흡착방지제로서), 및 선택적으로 (3) 약 10%±5% 농도의 수크로오스를 포함하거나, 또는 상기 성분들을 포함하는 제형으로부터 동결건조 CNP 제형이 제조된다.

[1064] [실시예 19]

[1065] CNP 변이체들의 임상 평가

[1066] 다음 실시예는 본 명세서의 치료 방법에서 CNP22 또는 그것의 변이체를 조성물의 임상 평가에 사용되는 파라미터들에 대한 지침을 제공한다. 본원에 개시된 대로, CNP22 또는 그것의 변이체들은 뼈 및 혈관 평활근의 질병을 포함하는 CNP에 반응성인 질병의 치료에서 사용될 것이다. 안전성, 약동학, 및 대용물 및 규정된 임상 종점의 초기 반응에 대해 CNP22 또는 그것의 변이체들의 용량을 평가하는 임상 시험이 수행될 것이다. 임상 시험은 반드시 그렇지는 않지만 약 100명의 평가 환자들을 대상으로 충분한 안전성 정보를 수집할 수 있도록 최소 24주 동안 수행될 것이다. 임상 시험의 초기 용량은 약 0.001에서 약 1.0mg/kg/주까지 다양하거나, 또는 본원에 설명된 용량들 중 하나일 것이다. 이 범위의 초기 용량에서 유의한 직접적인 임상적 이점이 생기지 않은 경우, 이 용량을 이 범위 내에서 또는 필요에 따라 이 범위를 넘어서 증가시키고, 추가의 최소 기간 동안 유지하는데, 반드시 그렇지는 않지만 추가로 안전성을 확립하고 효능을 평가할 수 있도록 24주 동안은 유지된다.

[1067] 안전성의 측정은 부작용, 알레르기 반응, 완전 임상 화학물질 패널(신장 및 간 기능을 포함한다), 소변검사 및 차등적 CBC를 포함한다. 이에 더하여, 임상적 이점과 관련된 다른 파라미터들도 모니터한다. 또한, 본 실시예는 흡수, 분포, 대사, 배설 그리고 혈중 반감기와 생체이용률을 포함하는 CNP22 또는 그것의 변이체들의 약동학적 파라미터들의 측정을 포함한다. 이러한 분석들이 용량과 임상 반응의 관계성을 확립하는데 도움이 된다는

것은 자명하다.

[1068] 방법

[1069] 환자들에 대해서 기본적인 병력과 신체 검사를 수행하고, 임상연구 테스트의 기준을 설정한다(CBC, Panel 20, CH50 및 UA를 포함한다). 환자들을 밀착 추적하며 클리닉에 매주 방문하도록 한다. 환자들은 치료기간이 완료되고 1주일 후에 클리닉을 방문하여 평가를 완료한다. 용량의 점진적 증가가 필요한 경우, 환자들은 상기 개략된 것과 동일한 일정을 따른다. 안전성은 시험기간 내내 모니터한다.

[1070] 진단 및 포함 기준

[1071] 환자는 잠재적 CNP-반응성 질병으로 서류상 진단된 남성 또는 여성일 수 있다. 잠재적 CNP-반응성 뼈-관련 질병의 특정 예는 연골무형성증이며, 이것은 유전자 검사 및 FGFR-3 돌연변이 또는 기능장애에 대한 다른 증거에 의해서 확인될 수 있다. 연골무형성증 환자의 전형적인 연령 범위는 유아(1세 미만)에서부터 청소년기 이전(13세 미만)까지일 것이다. 임신중이거나 수유중인 환자, 연구 등록 30일 이전에 연구 대상 약물을 복용한 환자, 또는 의학적 상태, 중증 병발증 또는 연구 순응성을 유의하게 감소시킬 수 있는 다른 참작할 만한 환경을 가진 환자들은 연구에서 배제될 것이다.

[1072] 안전성

[1073] CNP22 또는 그것의 변이체들을 사용한 치료요법은 연구 과정 동안 유의한 급성 또는 만성 약물 반응을 일으키지 않는다면 안전하다고 결정될 것이다. 이 약물의 장기 투여는 임상검사, 임상연구 또는 다른 적절한 연구들에서 유의한 이상이 관찰되지 않는다면 안전하다고 결정될 것이다.

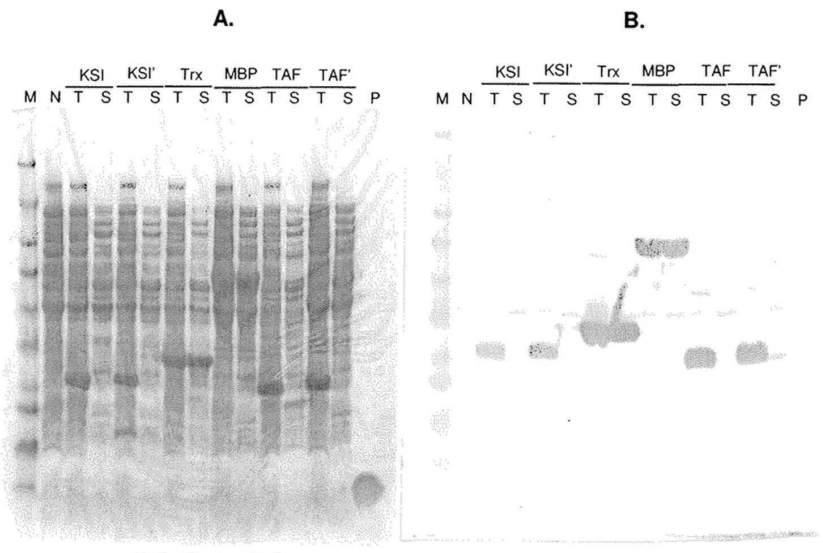
[1074] 야생형 CNP22와 비교해서, 본 명세서의 특정 CNP 변이체들은 생체외 NEP 변성에 대해 훨씬 더 내성이고, 래트에서 훨씬 더 긴 혈장 반감기와 생체이용률을 가지며, 래트에서 훨씬 더 높은 수준의 cGMP 생산을 자극하고, 및/또는 연골무형성증 마우스에서 긴 뼈 길이와 신장의 상당히 큰 증가를 유도하는 것으로 나타났다. 또한, CNP22에 의한 짧은 기간의 투약 섭생 치료는 생체외생체외 성장의 FGF2-유도 중단을 반전시키는데 있어서 거의 연속 CNP22 치료만큼 효과적이다. 본원에 설명된 다른 결과들 중에서도 특히 이들 결과는 뼈-관련 질병 및 혈관 평활근 질병과 같은 CNP-반응성 상태 또는 질병을 치료하는데 있어서 본 명세서의 CNP 변이체들의 이용성을 증명한다.

[1075] 본원에 설명된 발명의 내용에 관한 모든 구체예는 본원에 설명된 다른 구체예들 중 하나 이상과 선택적으로 조합될 수 있다는 것이 이해된다. 본원에 인용된 모든 특허문헌 및 모든 비특허문헌은 그 전문이 참고자료로 본원에 포함된다.

[1076] 본원에 설명된 구체예들과 예시적인 실시예들에 제시된 대로 본 명세서에 대한 다수의 변형과 변화들이 당업자에게 떠오를 것이라고 예상된다. 따라서, 첨부된 청구항들에 나타난 것과 같은 제한은 본 명세서에만 적용되어야 한다.

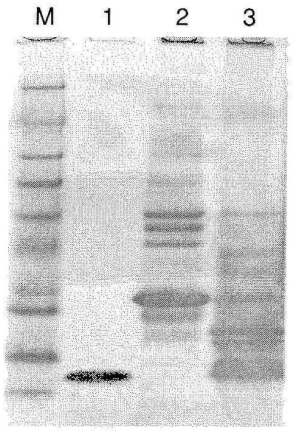
도면

도면1

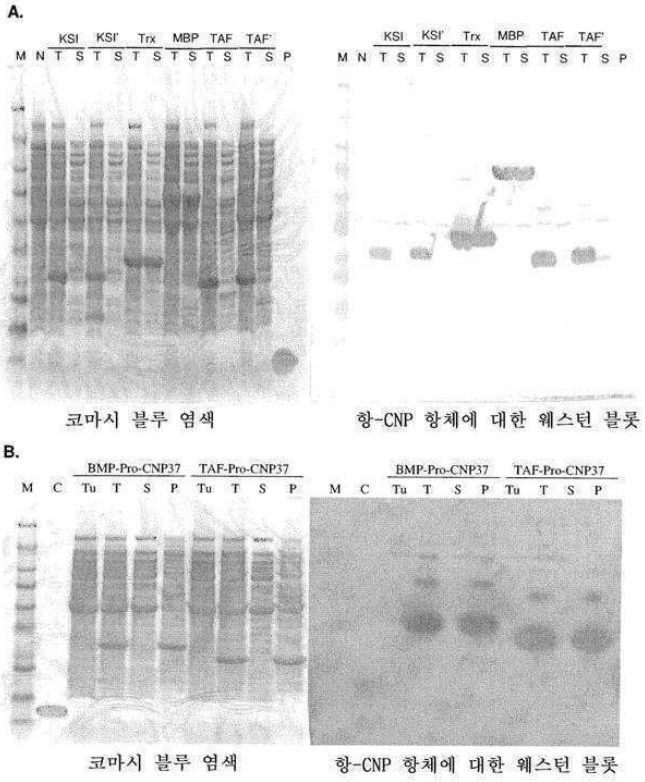


코마시 블루 염색 항-CNP 항체에 대한 웨스턴 블롯

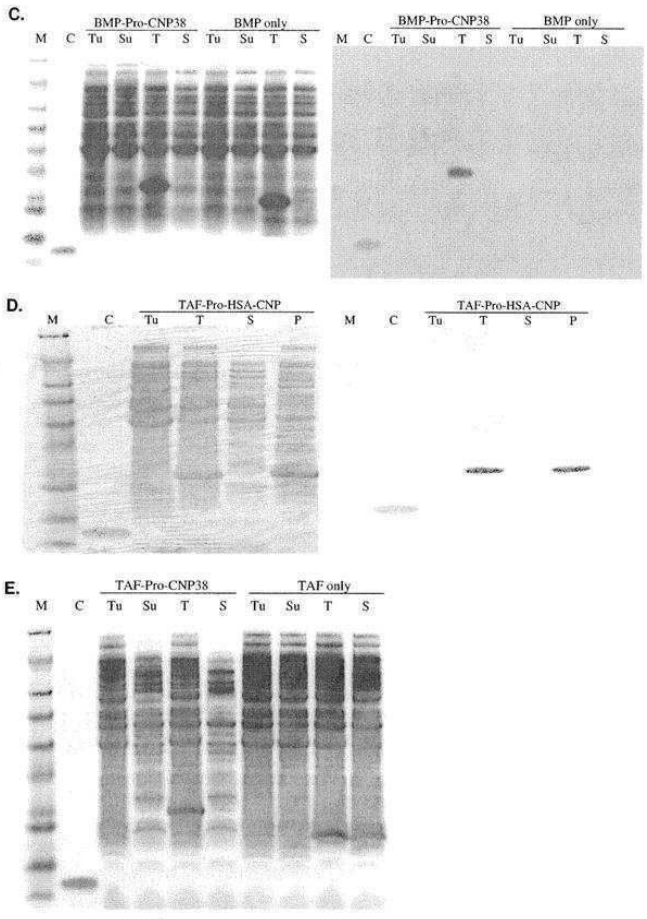
도면2



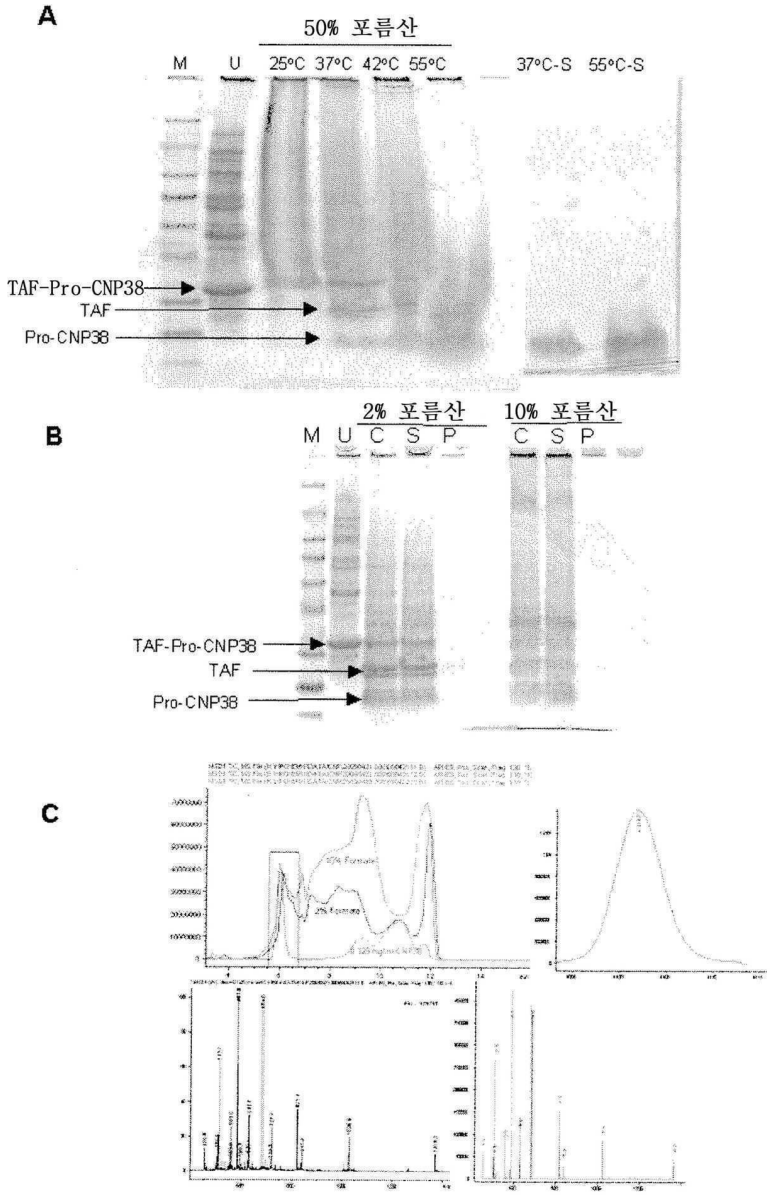
도면3a


A.
KSI KSI' Trx MBP TAF TAF'
M N T S T S T S T S T S T S P
코마시 블루 염색
KSI KSI' Trx MBP TAF TAF'
M N T S T S T S T S T S T S P
항-CNP 항체에 대한 웨스턴 블롯
B.
BMP-Pro-CNP37 TAF-Pro-CNP37
M C Tu T S P Tu T S P
코마시 블루 염색
BMP-Pro-CNP37 TAF-Pro-CNP37
M C Tu T S P Tu T S P
항-CNP 항체에 대한 웨스턴 블롯

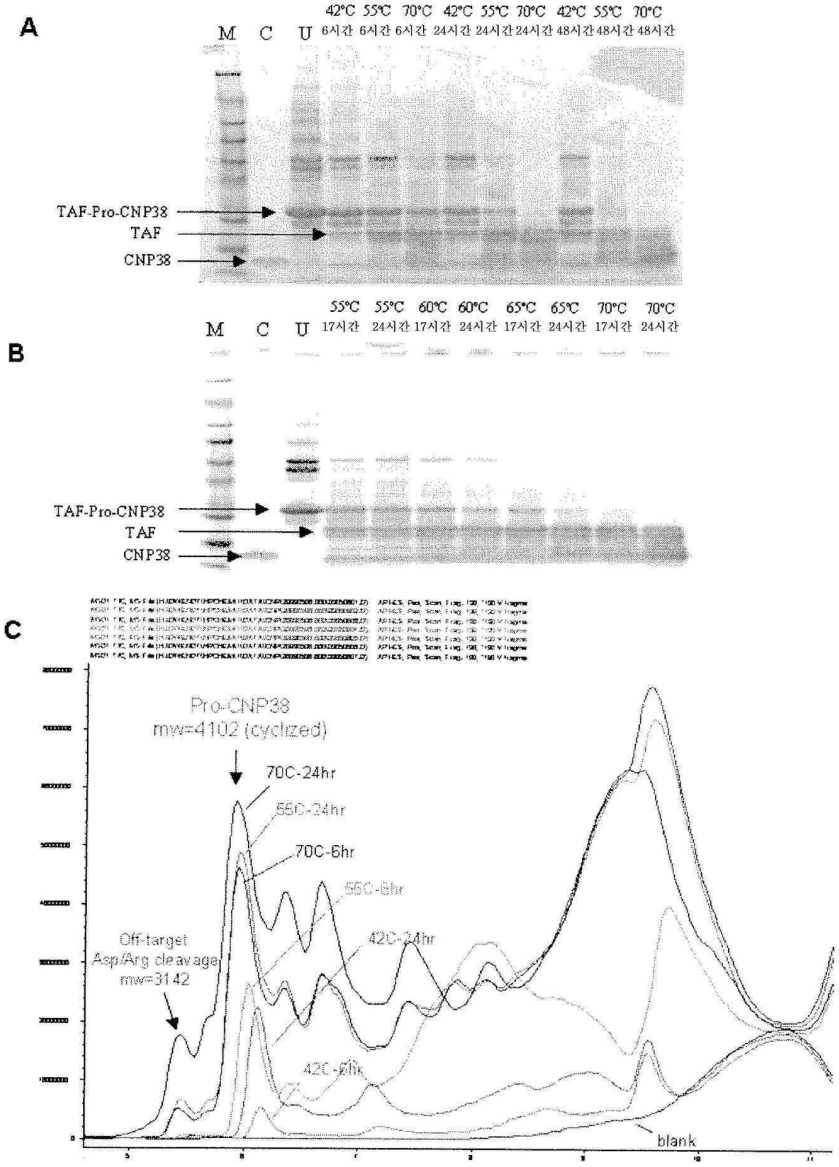
도면3b


C.
BMP-Pro-CNP38
BMP only
M C Tu Su T S Tu Su T S
M C Tu Su T S Tu Su T S
D.
TAF-Pro-HSA-CNP
M C Tu T S P
M C Tu T S P
E.
TAF-Pro-CNP38
TAF only
M C Tu Su T S Tu Su T S

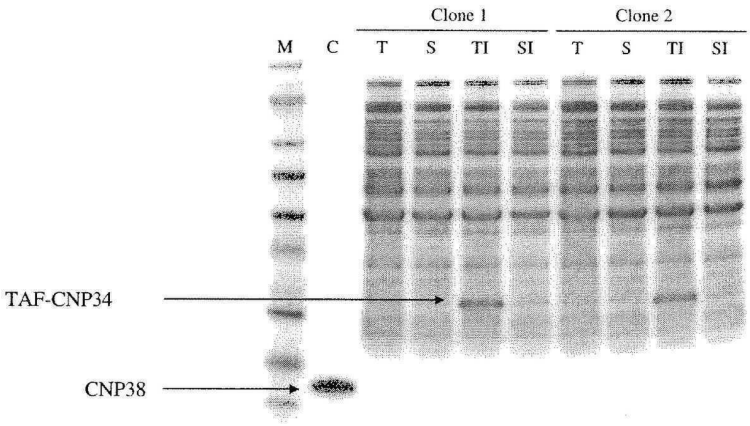
도면4


A
50% 포름산
M
U
25°C
37°C
42°C
55°C
37°C-S
55°C-S
TAF-Pro-CNP38
TAF
Pro-CNP38
B
2% 포름산
10% 포름산
M
U
C
S
P
C
S
P
TAF-Pro-CNP38
TAF
Pro-CNP38
C

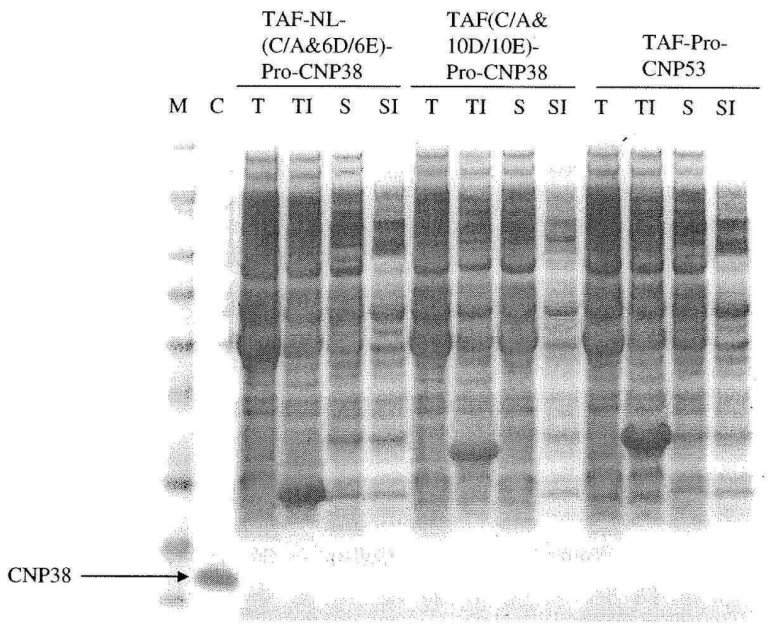
도면5


A
M C U
42℃ 6시간
55℃ 6시간
70℃ 6시간
42℃ 24시간
55℃ 24시간
70℃ 24시간
42℃ 48시간
55℃ 48시간
70℃ 48시간
TAF-Pro-CNP38
TAF
CNP38
B
M C U
55℃ 17시간
55℃ 24시간
60℃ 17시간
60℃ 24시간
65℃ 17시간
65℃ 24시간
70℃ 17시간
70℃ 24시간
TAF-Pro-CNP38
TAF
CNP38
C
Pro-CNP38
mw=4102 (cyclized)
70C-24hr
55C-24hr
70C-6hr
55C-6hr
42C-24hr
42C-6hr
Off-target
Asp/Arg cleavage
mw=3142
blank

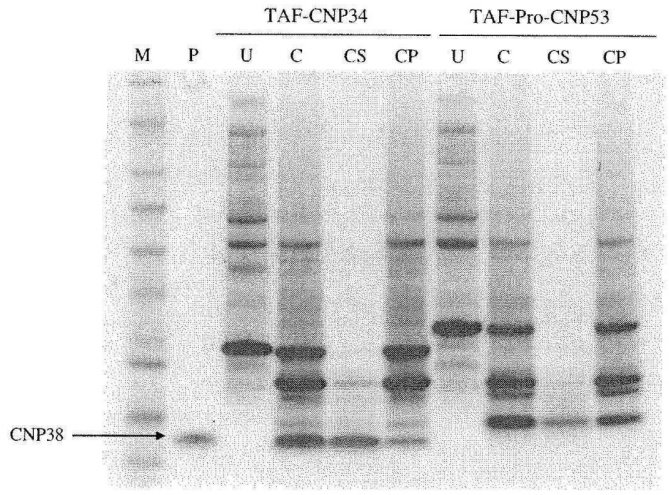
도면6


Clone 1
Clone 2
M C T S TI SI T S TI SI
TAF-CNP34
CNP38

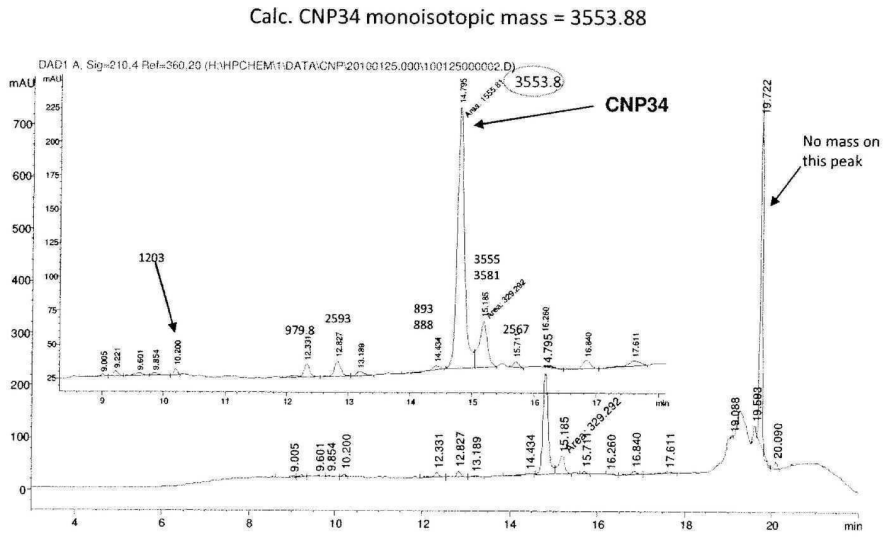
도면7


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

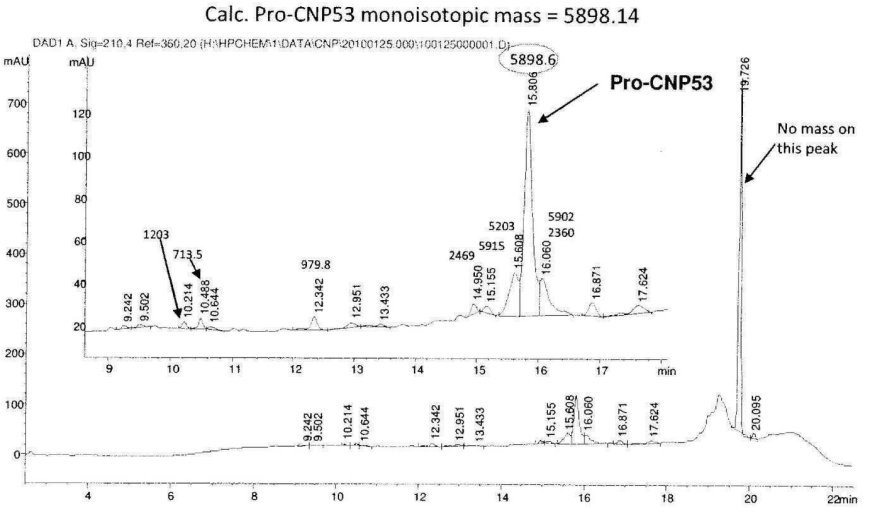
도면8


TAF-CNP34
TAF-Pro-CNP53
M P U C CS CP U C CS CP
CNP38

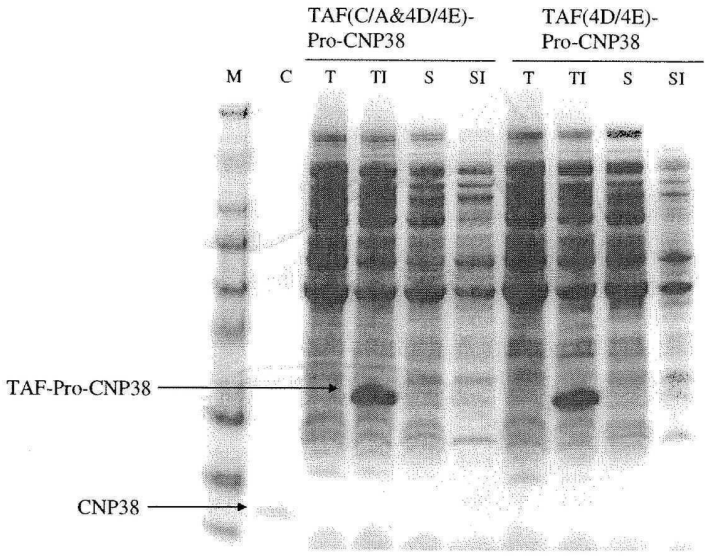
도면9


Calc. CNP34 monoisotopic mass = 3553.88
3553.8
CNP34
No mass on this peak
1203
979.8
2593
893
888
3555
3581
2567
19.722
mAU
min

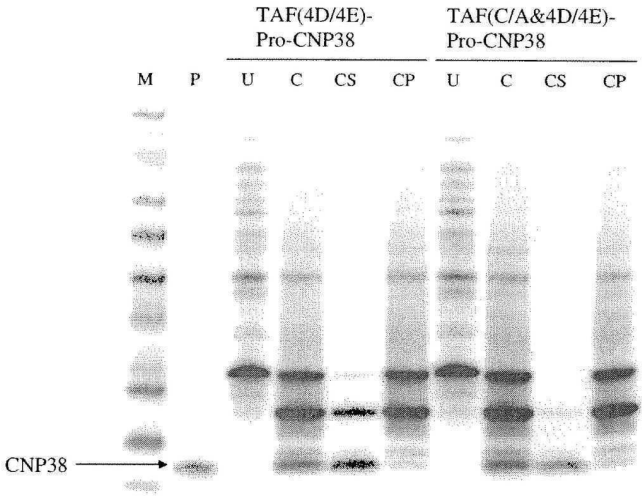
도면10


Calc. Pro-CNP53 monoisotopic mass = 5898.14
5898.6
Pro-CNP53
No mass on this peak
1203
713.5
979.8
5203
5915
5902
2360
2469
19.726
mAU
min

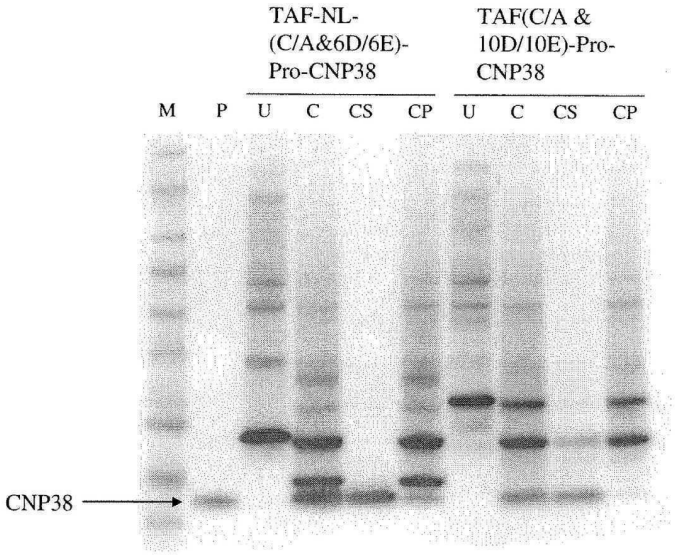
도면11


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

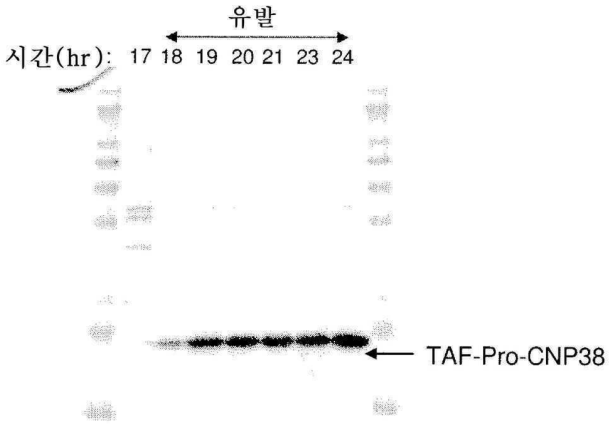
도면12


TAF(4D/4E)-
Pro-CNP38
TAF(C/A&4D/4E)-
Pro-CNP38
M
P
U
C
CS
CP
U
C
CS
CP
CNP38

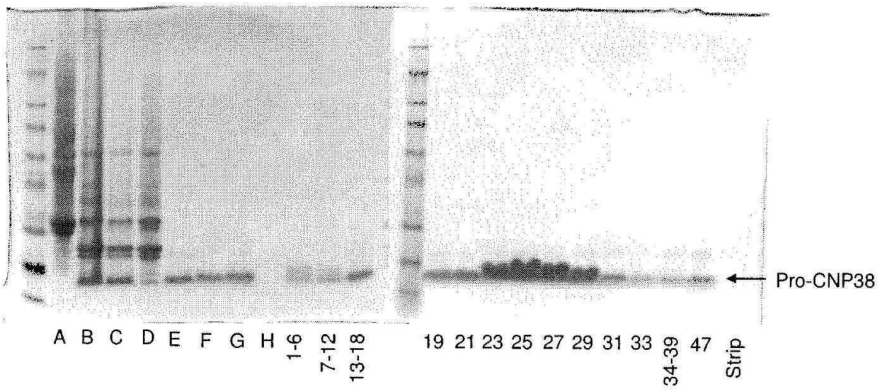
도면13



도면14

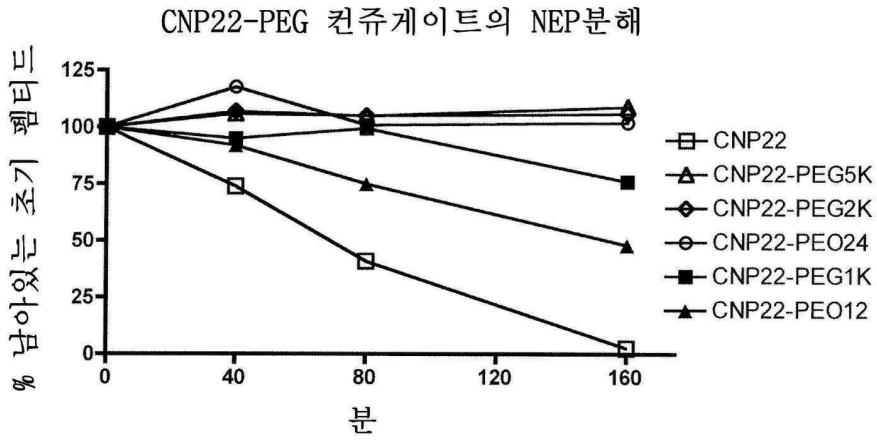


도면15

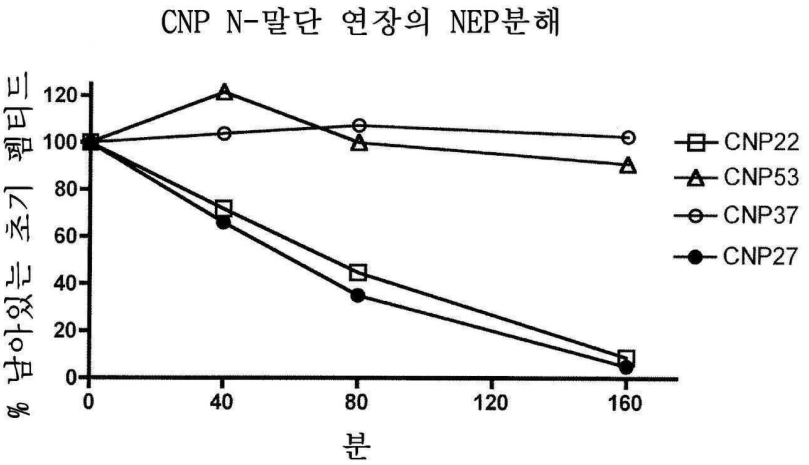


SP-Sepharose 용출 분획

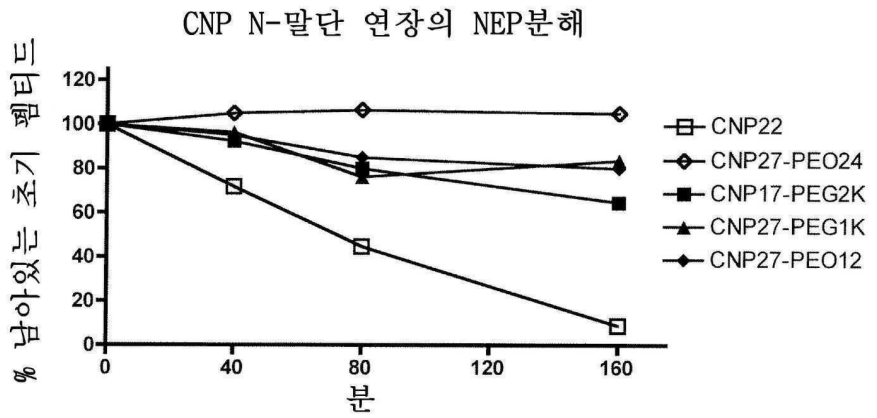
도면16



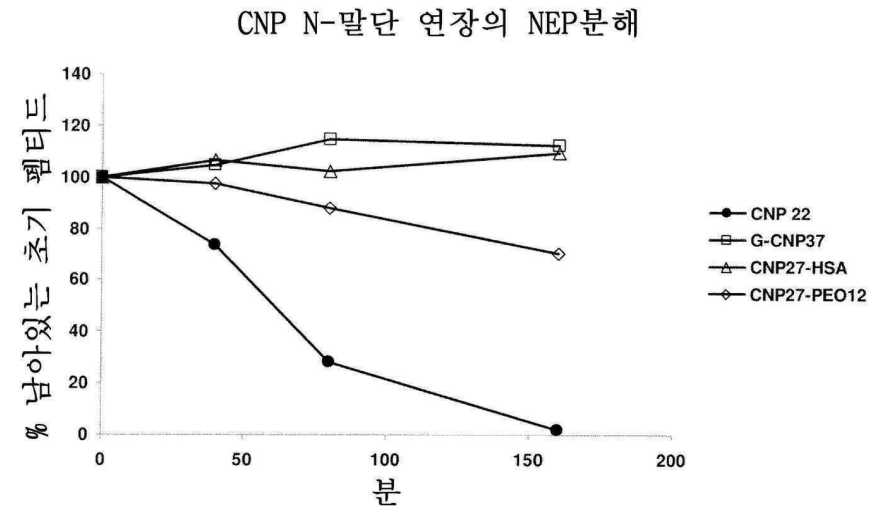
도면17



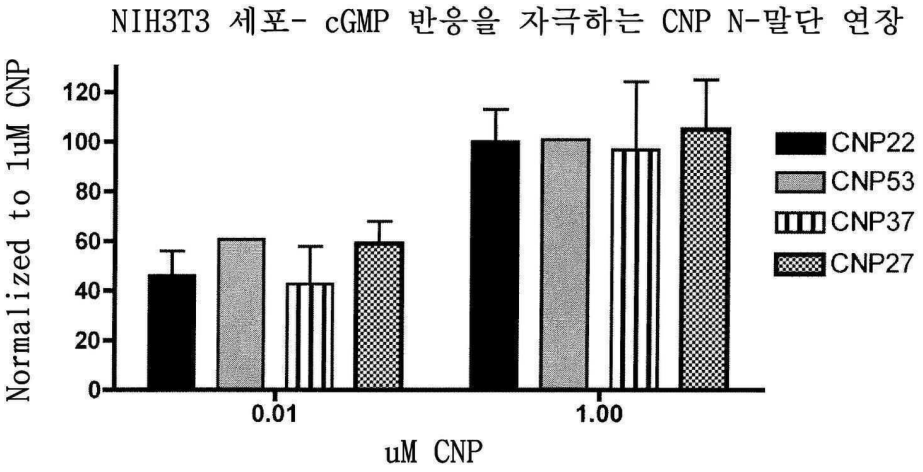
도면18



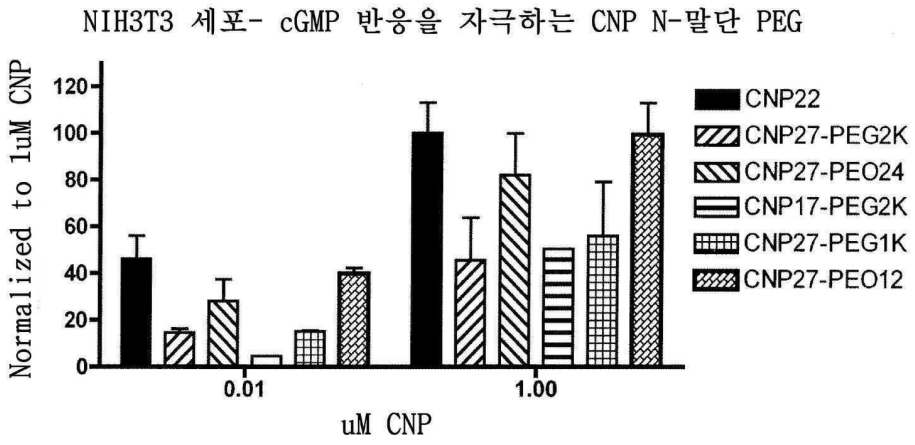
도면19



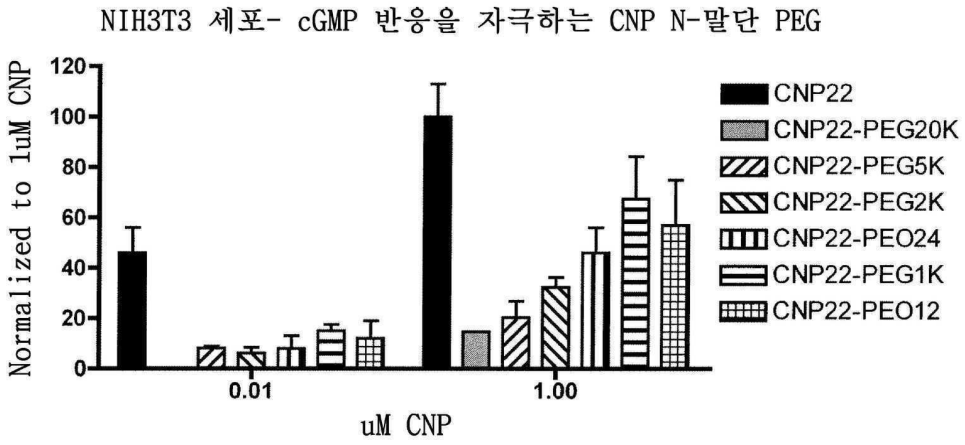
도면20



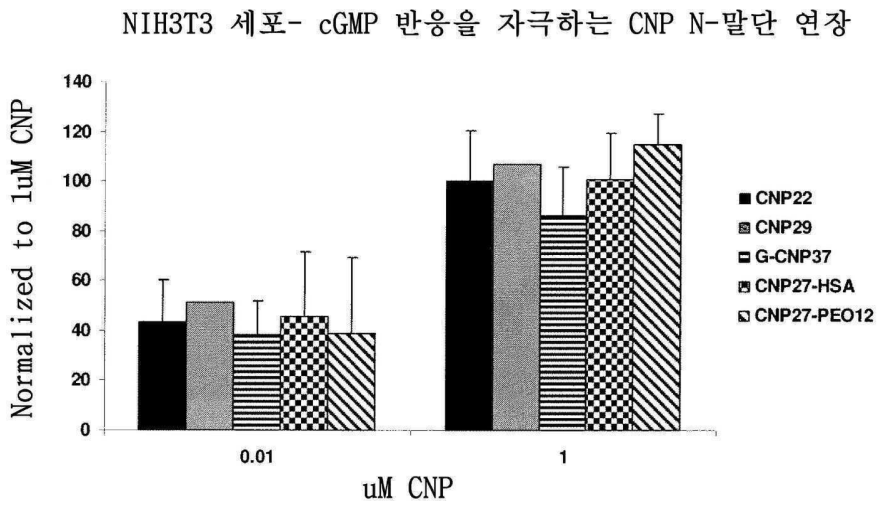
도면21



도면22

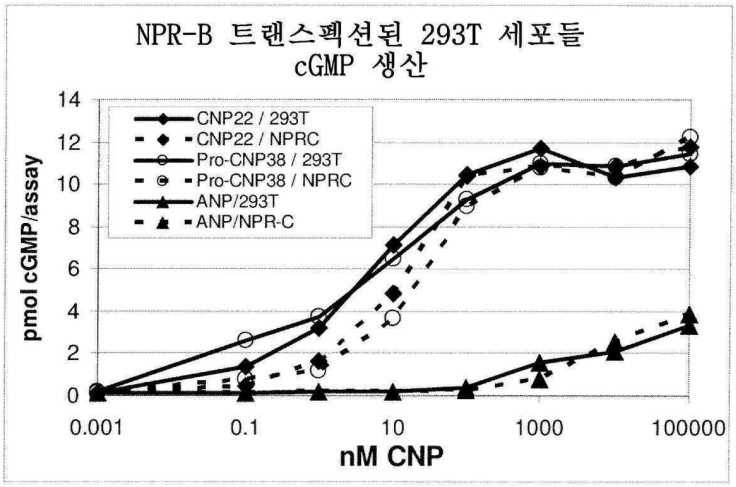

NIH3T3 세포- cGMP 반응을 자극하는 CNP N-말단 PEG
Normalized to 1uM CNP
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1.00
uM CNP
CNP22
CNP22-PEG20K
CNP22-PEG5K
CNP22-PEG2K
CNP22-PEO24
CNP22-PEG1K
CNP22-PEO12

도면23

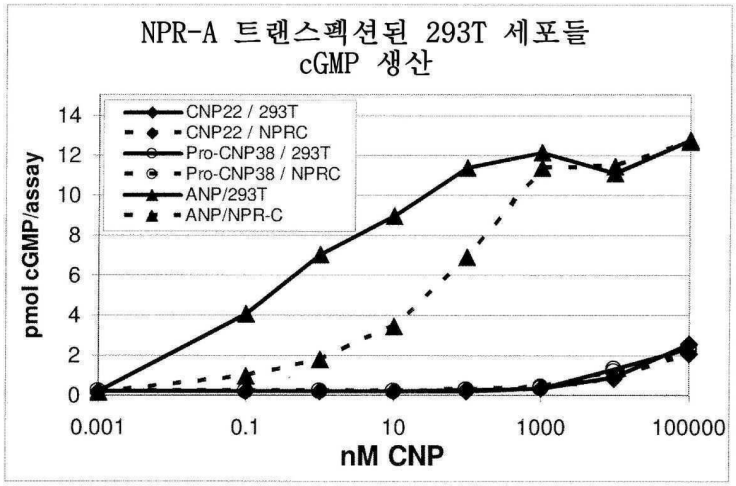

NIH3T3 세포- cGMP 반응을 자극하는 CNP N-말단 연장
Normalized to 1uM CNP
140
120
100
80
60
40
20
0
0.01
1
uM CNP
CNP22
CNP29
G-CNP37
CNP27-HSA
CNP27-PEO12

도면24

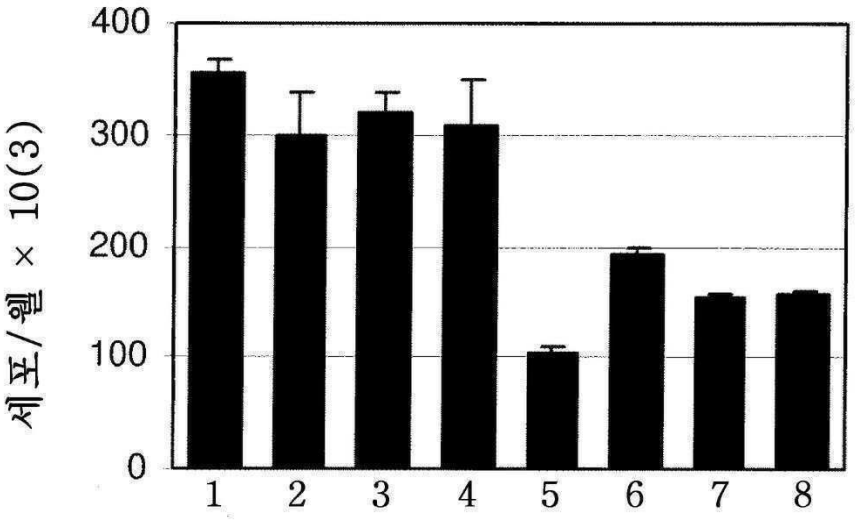
A.


NPR-B 트랜스펙션된 293T 세포들
cGMP 생산
CNP22 / 293T
CNP22 / NPRC
Pro-CNP38 / 293T
Pro-CNP38 / NPRC
ANP/293T
ANP/NPR-C
pmol cGMP/assay
0
2
4
6
8
10
12
14
0.001
0.1
10
1000
100000
nM CNP

B.

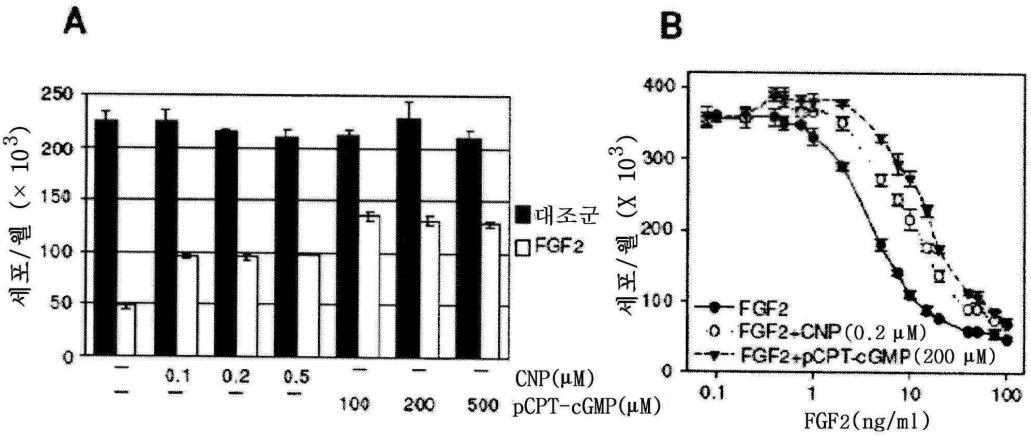

NPR-A 트랜스펙션된 293T 세포들
cGMP 생산
CNP22 / 293T
CNP22 / NPRC
Pro-CNP38 / 293T
Pro-CNP38 / NPRC
ANP/293T
ANP/NPR-C
pmol cGMP/assay
0
2
4
6
8
10
12
14
0.001
0.1
10
1000
100000
nM CNP

도면25

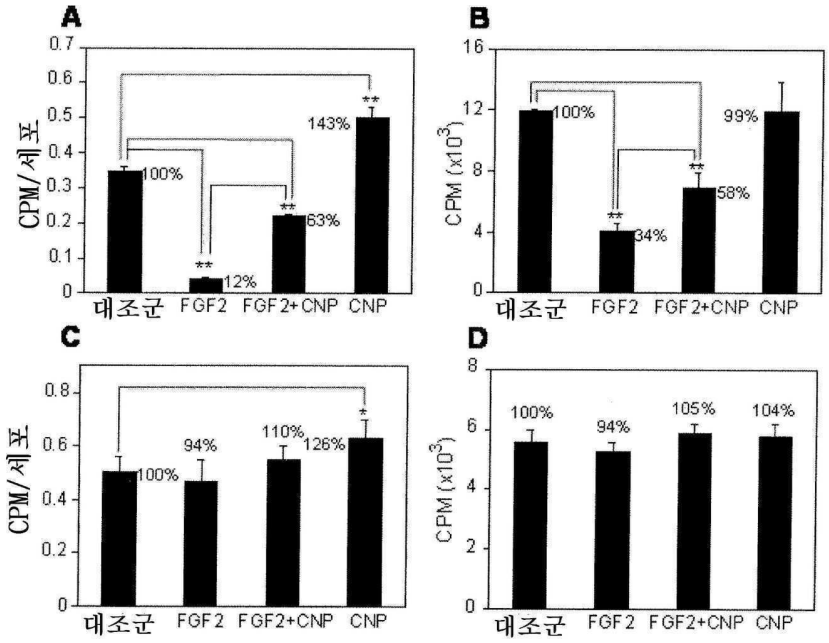


1 대조군 (no CNP22, no FGF2)
2 CNP22 (0.2 uM) 계속
3 CNP22 (0.2 uM) 하루 1회 1시간
4 CNP22 (0.2 uM) 하루 1회 2시간
5 FGF2 (5 ng/mL) 계속
6 FGF2 + CNP22 (0.2 uM) 계속
7 FGF2 + CNP22 (0.2 uM) 하루 1회 1시간
8 FGF2 + CNP22 (0.2 uM) 하루 1회 2시간

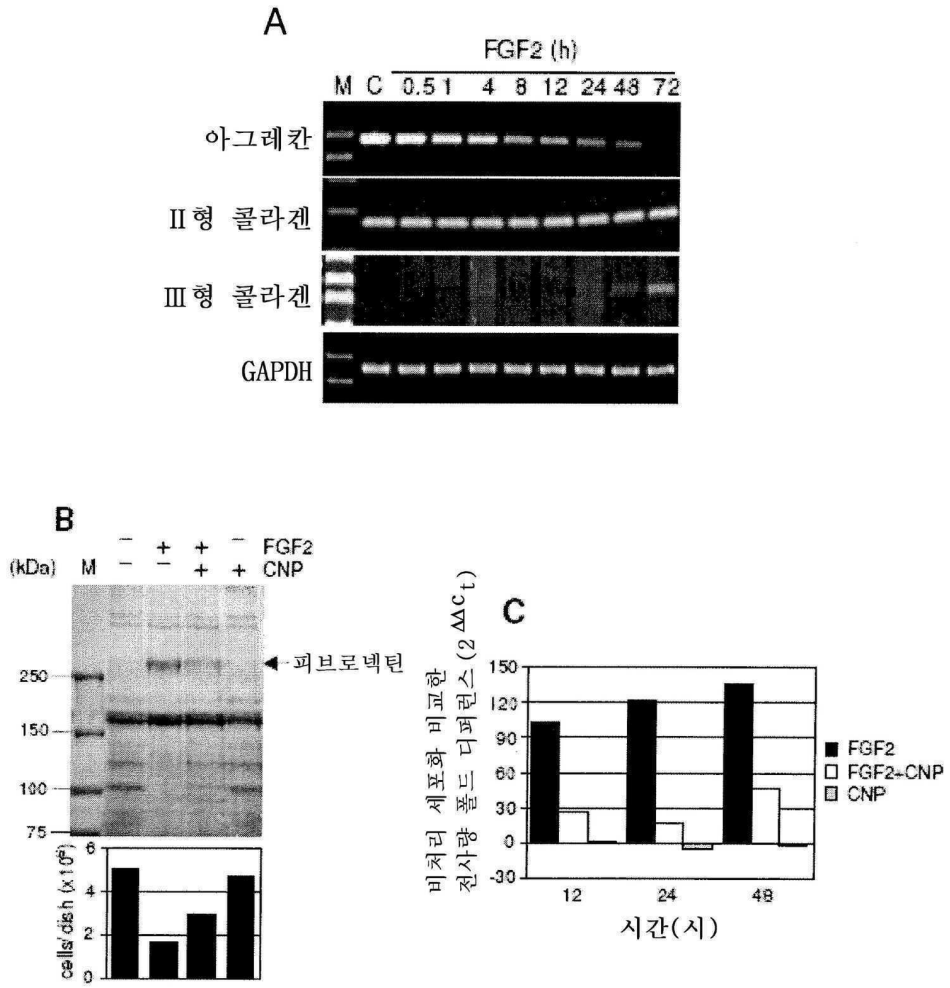
도면26


A
B
세포/웰 (× 10³)
대조군
FGF2
CNP(μM)
pCPT-cGMP(μM)
세포/웰 (X 10³)
FGF2
FGF2+CNP(0.2 μM)
FGF2+pCPT-cGMP(200 μM)
FGF2(ng/ml)

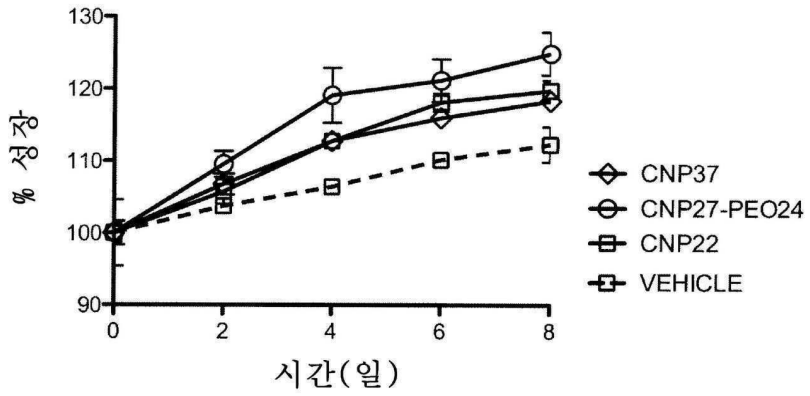
도면27


A
B
C
D
CPM/세포
CPM (x10³)
100%
12%
63%
143%
34%
58%
99%
94%
110%
126%
104%
105%
대조군
FGF2
FGF2+CNP
CNP

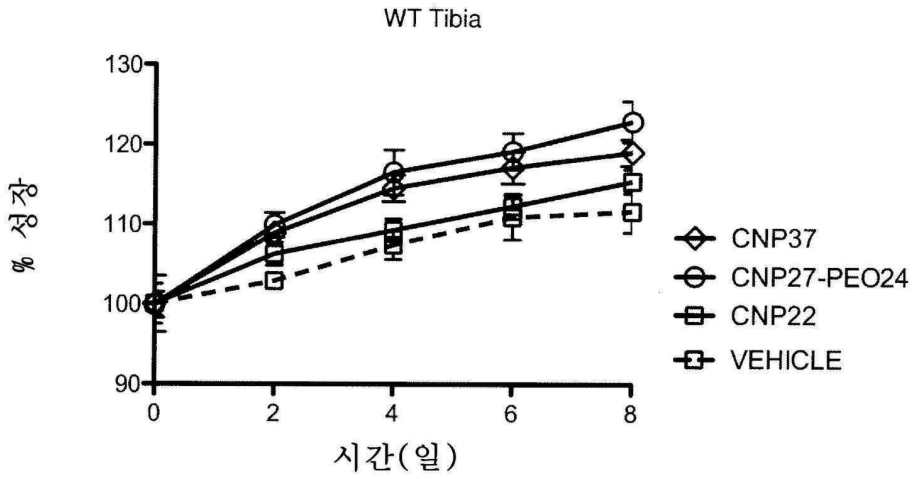
도면28


A
FGF2 (h)
M C 0.5 1 4 8 12 24 48 72
아그레칸
II형 콜라겐
III형 콜라겐
GAPDH
B
(kDa) M
FGF2
CNP
250
150
100
75
피브로넥틴
cells/ dish (x10⁴)
C
비처리 세포와 비교한 전사량 폴드 디퍼런스 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
150
120
90
60
30
0
-30
12
24
48
시간(시)
FGF2
FGF2+CNP
CNP

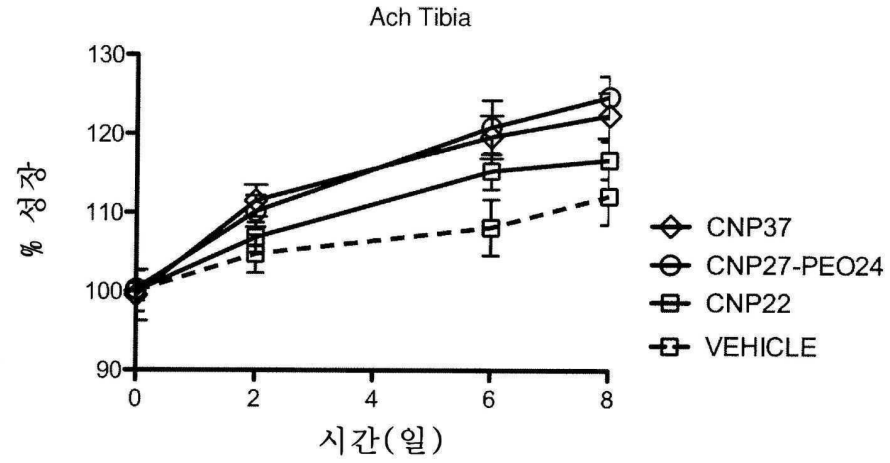
도면29


% 성장
130
120
110
100
90
0
2
4
6
8
시간(일)
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
VEHICLE

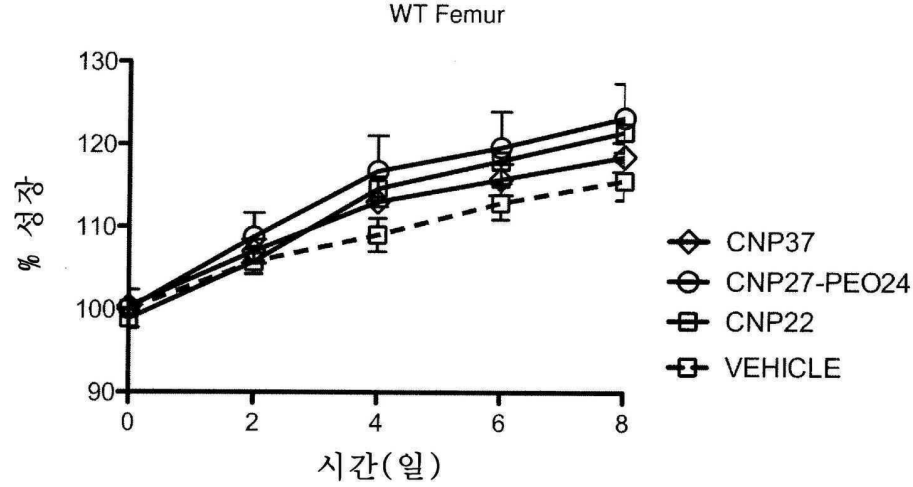
도면30



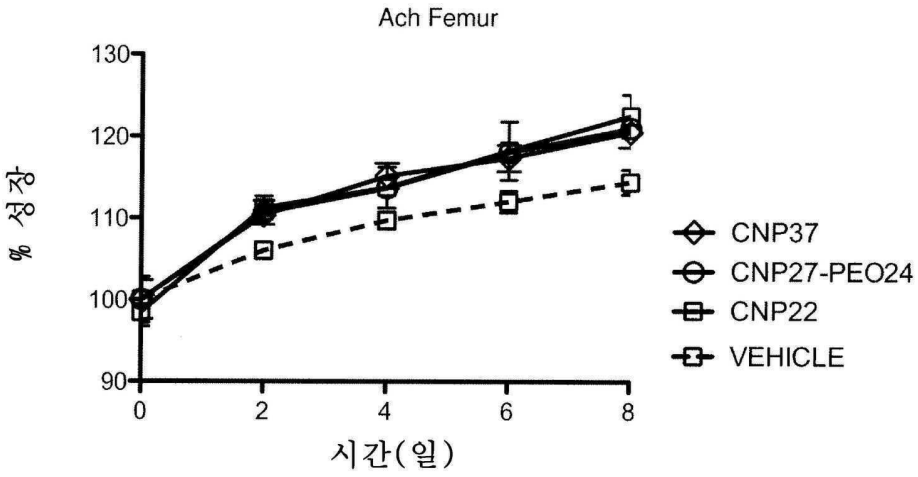
도면31



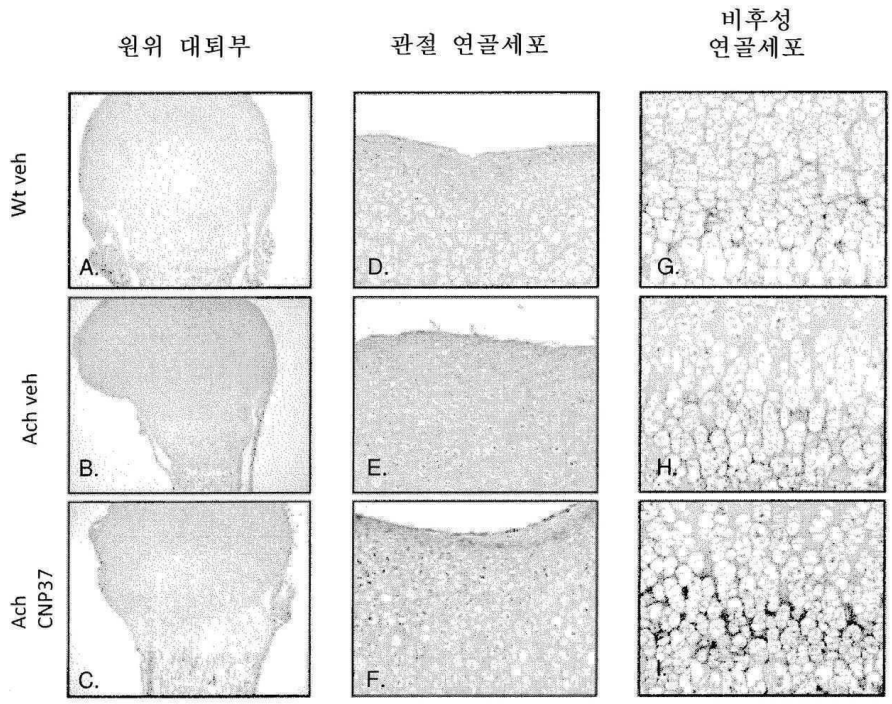
도면32



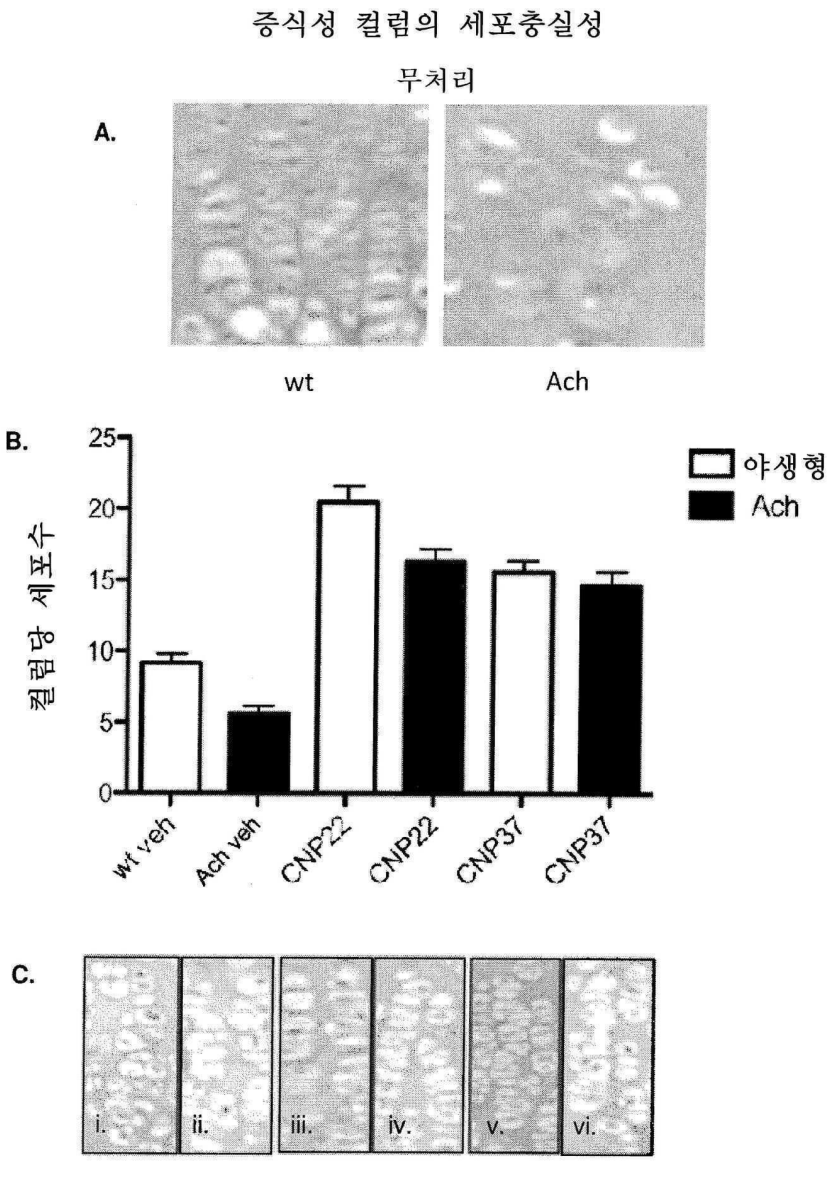
도면33


Ach Femur
130
120
110
100
90
% 성장
0
2
4
6
8
시간(일)
CNP37
CNP27-PEO24
CNP22
VEHICLE

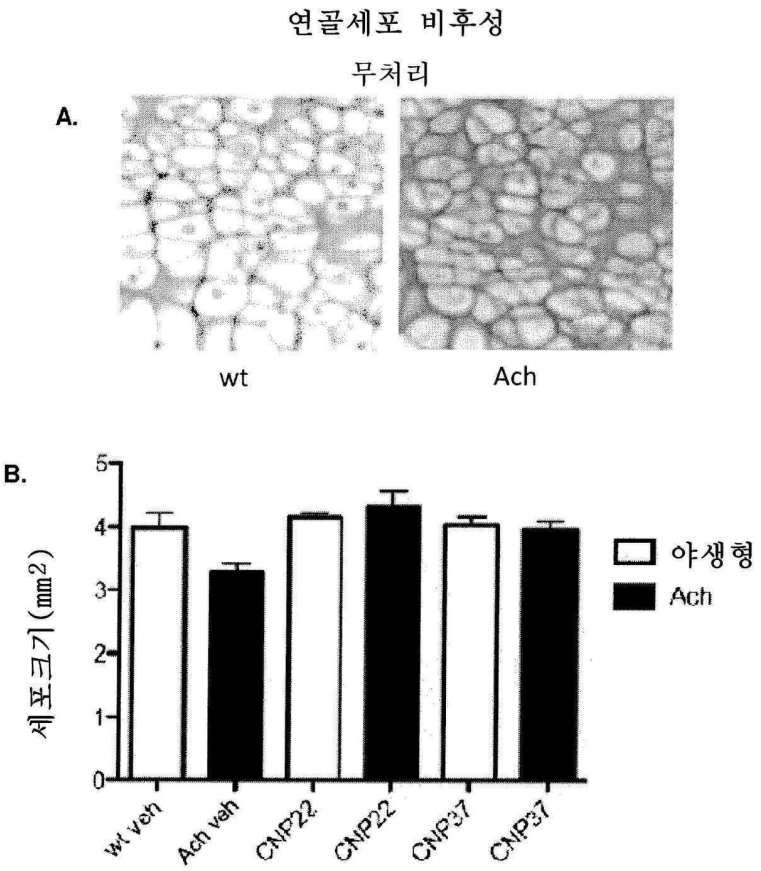
도면34


원위 대퇴부
관절 연골세포
비후성
연골세포
Wt veh
Ach veh
Ach
CNP37
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.

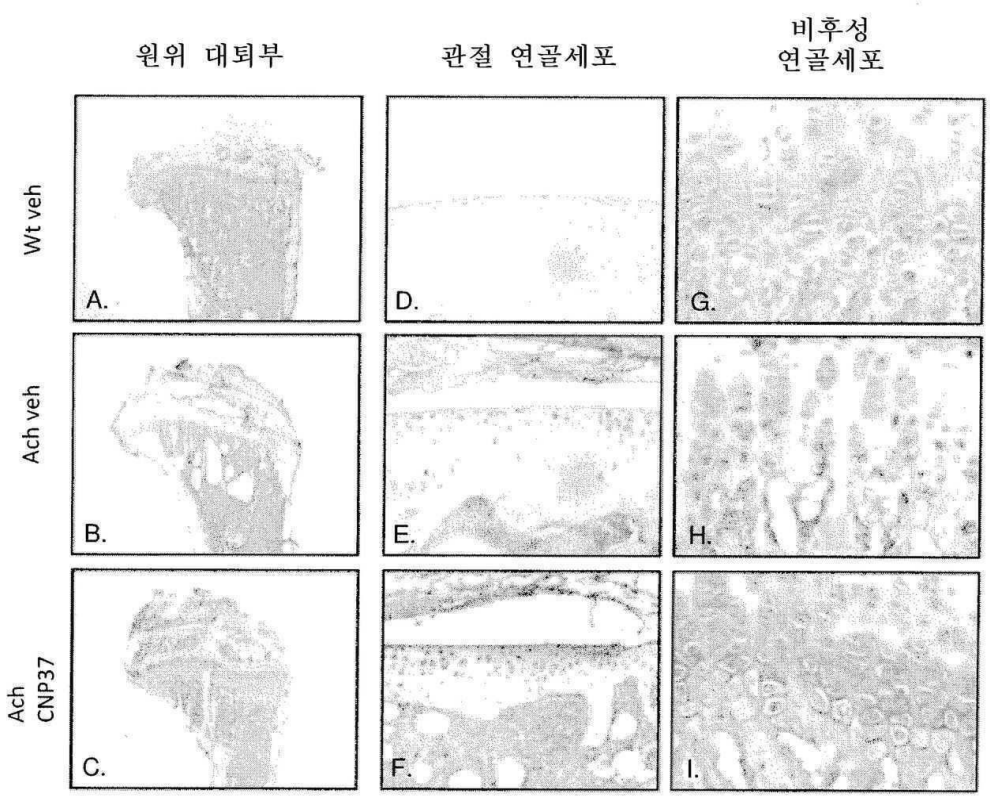
도면35


증식성 컬럼의 세포충실성
무처리
A.
wt
Ach
B.
컬럼당 세포수
25
20
15
10
5
0
야생형
Ach
wt veh
Ach veh
CNP22
CNP22
CNP37
CNP37
C.
i.
ii.
iii.
iv.
v.
vi.

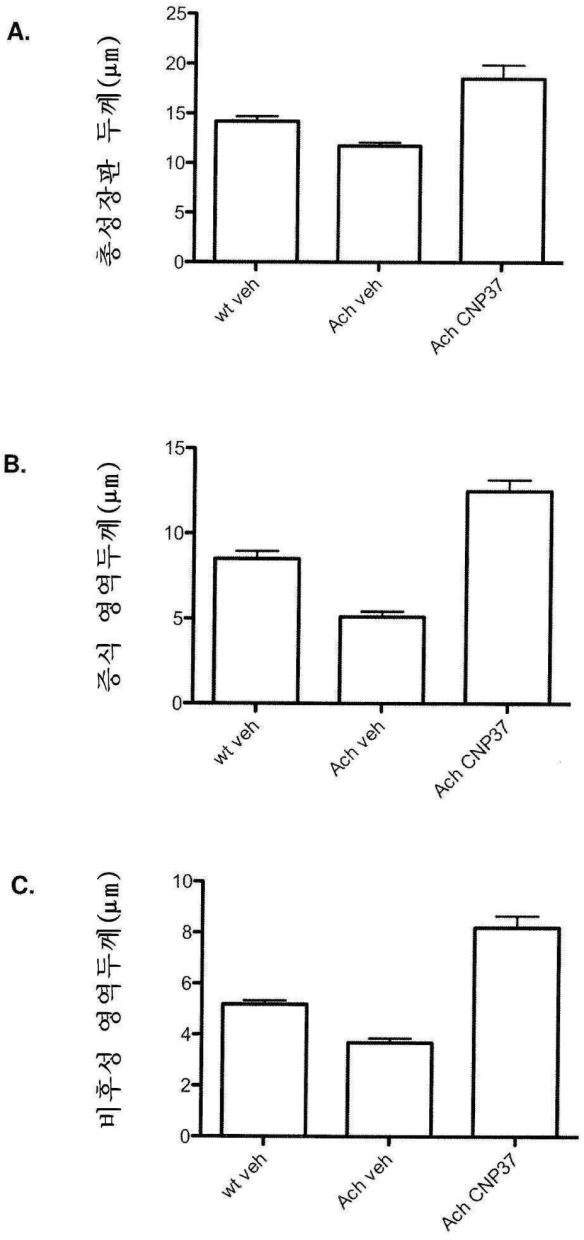
도면36


연골세포 비후성
무처리
A.
wt
Ach
B.
세포크기 (mm²)
0
1
2
3
4
5
wt veh
Ach veh
CNP22
CNP22
CNP37
CNP37
야생형
Ach
C.
i.
ii.
iii.
iv.
v.
vi.

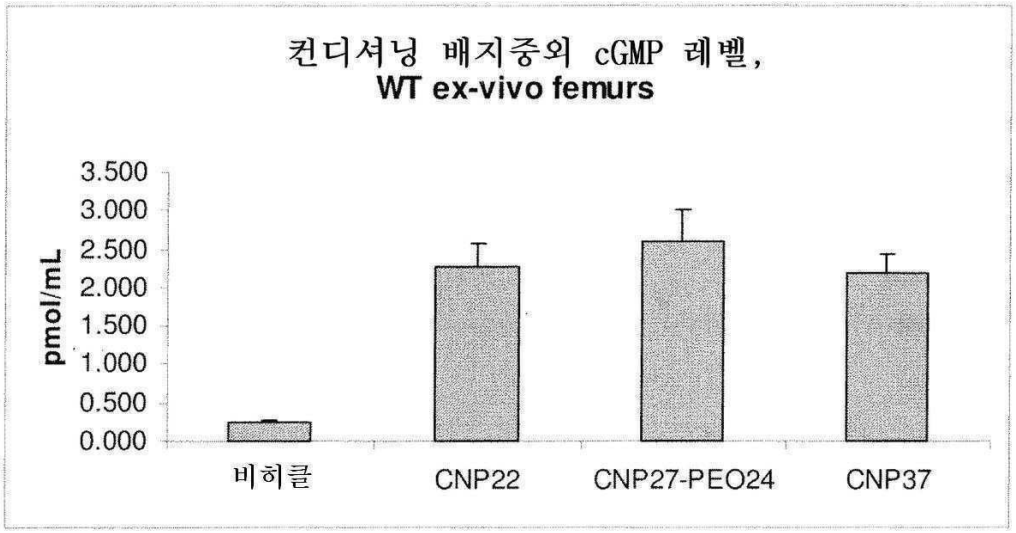
도면37



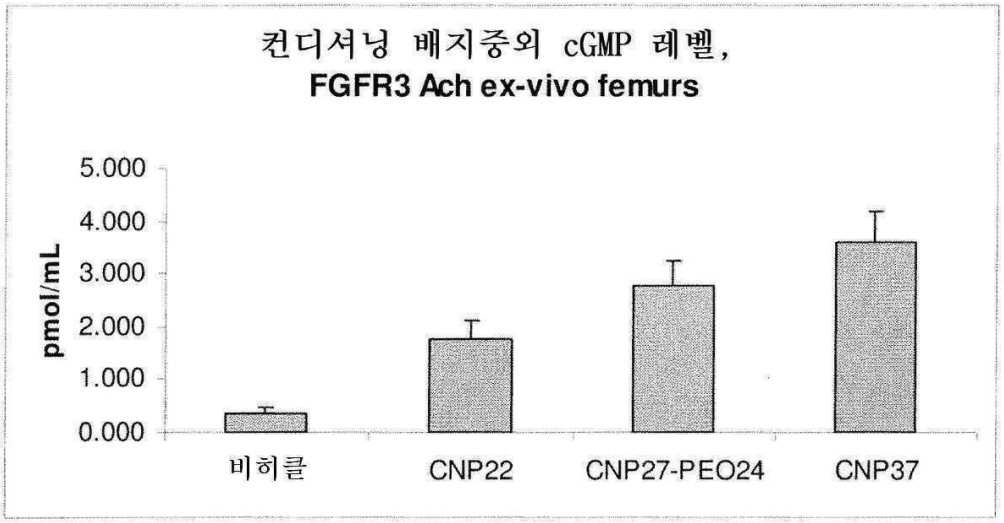
도면38


A.
총성장판 두께(μm)
25
20
15
10
5
0
wt veh
Ach veh
Ach CNP37
B.
증식 영역두께(μm)
15
10
5
0
wt veh
Ach veh
Ach CNP37
C.
비후성 영역두께(μm)
10
8
6
4
2
0
wt veh
Ach veh
Ach CNP37

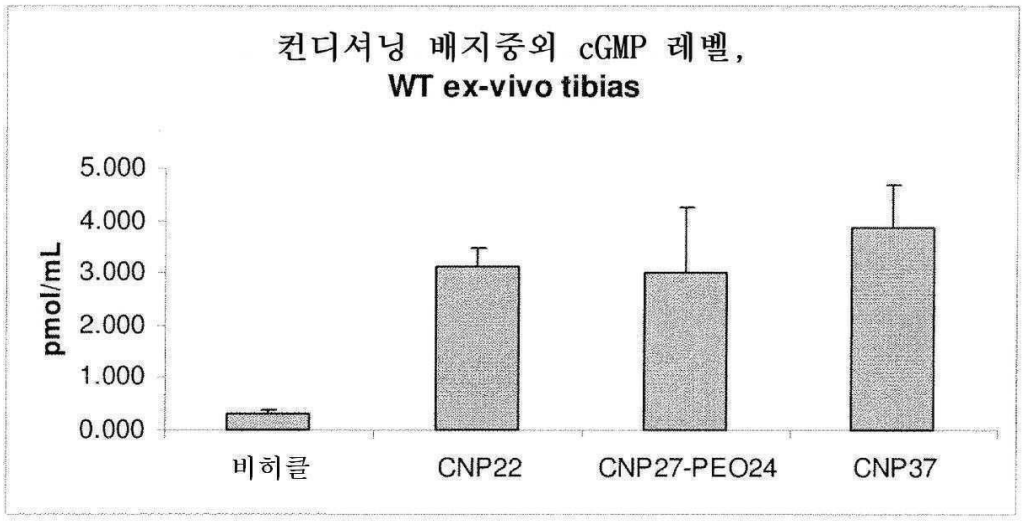
도면39


컨디셔닝 배지중외 cGMP 레벨,
WT ex-vivo femurs
pmol/mL
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
비히클
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

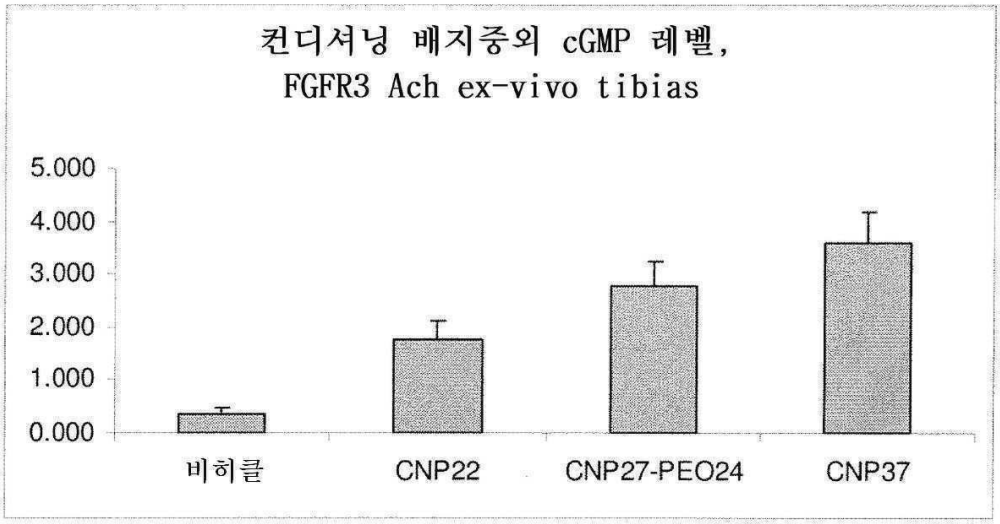
도면40


컨디셔닝 배지중외 cGMP 레벨,
FGFR3 Ach ex-vivo femurs
pmol/mL
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
비히클
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

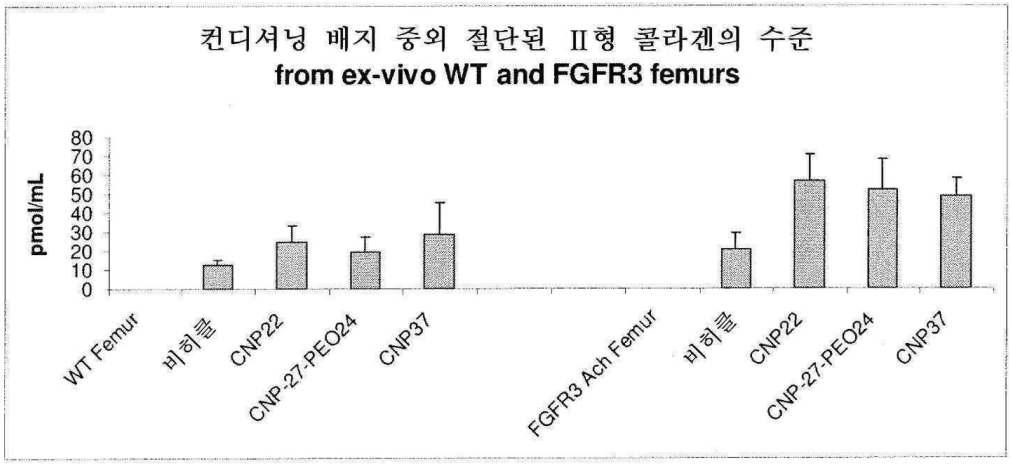
도면41


컨디셔닝 배지중외 cGMP 레벨,
WT ex-vivo tibias
pmol/mL
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
비히클
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

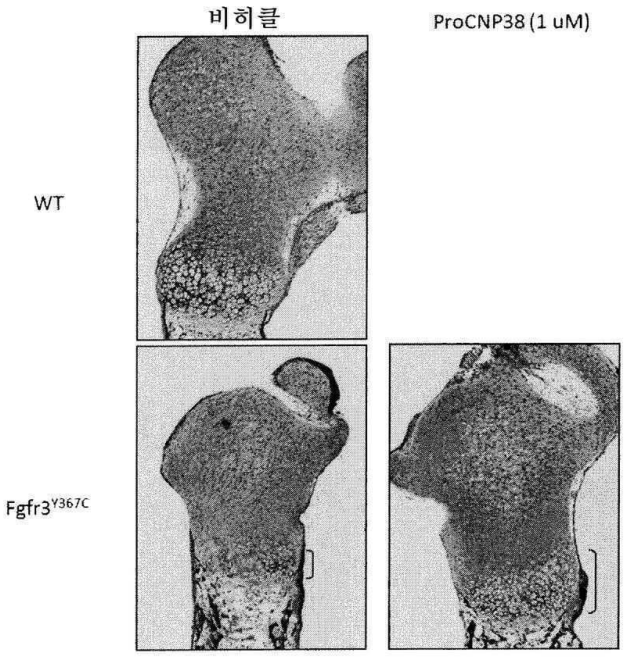
도면42


컨디셔닝 배지중외 cGMP 레벨,
FGFR3 Ach ex-vivo tibias
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
비히클
CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

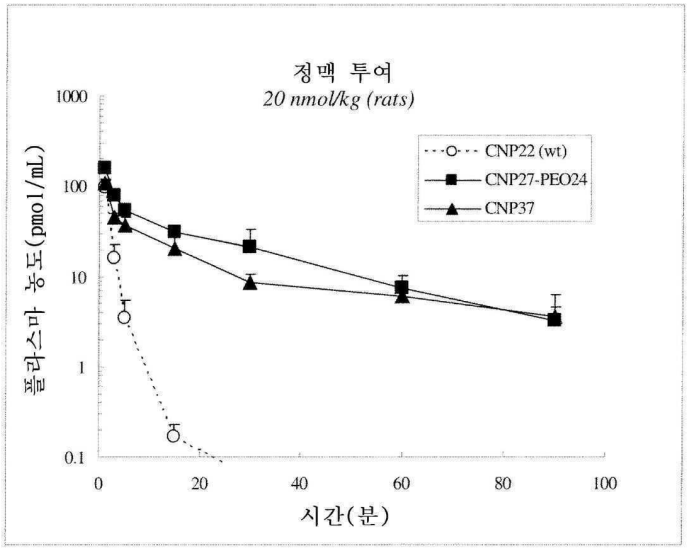
도면43


컨디셔닝 배지 중외 절단된 II형 콜라겐의 수준
from ex-vivo WT and FGFR3 femurs
pmol/mL
80
70
60
50
40
30
20
10
0
WT Femur
비히클
CNP22
CNP-27-PEO24
CNP37
FGFR3 Ach Femur
비히클
CNP22
CNP-27-PEO24
CNP37

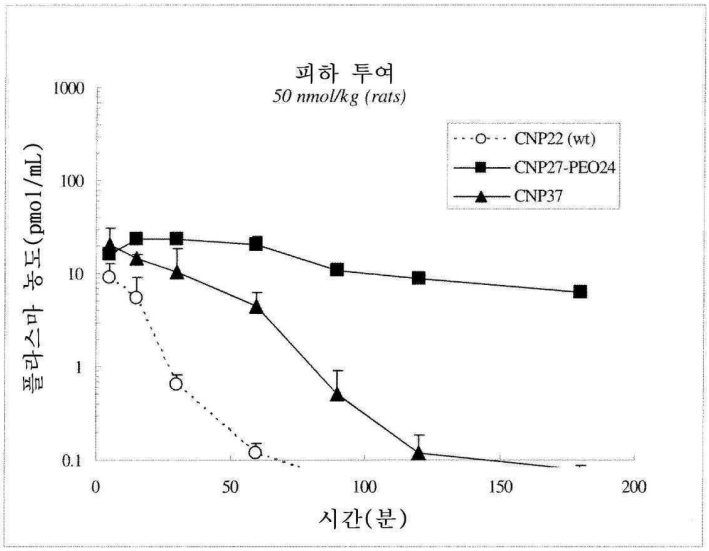
도면44


비히클
ProCNP38 (1 uM)
WT
Fgfr3Y367C

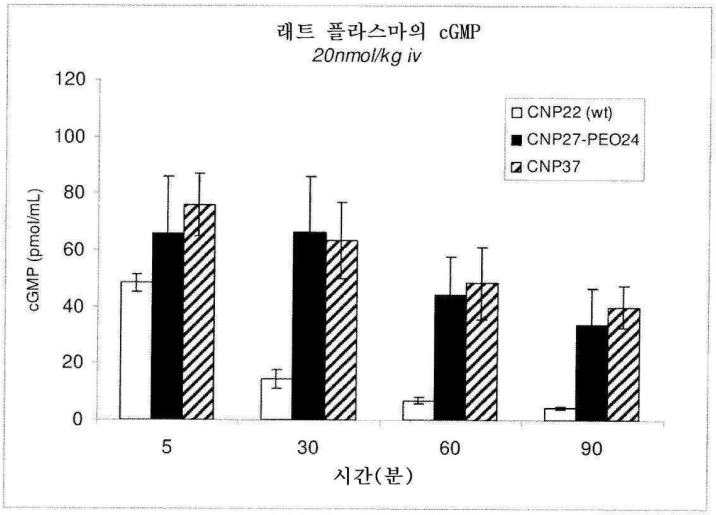
도면45


정맥 투여
20 nmol/kg (rats)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
플라스마 농도(pmol/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
20
40
60
80
100
시간(분)

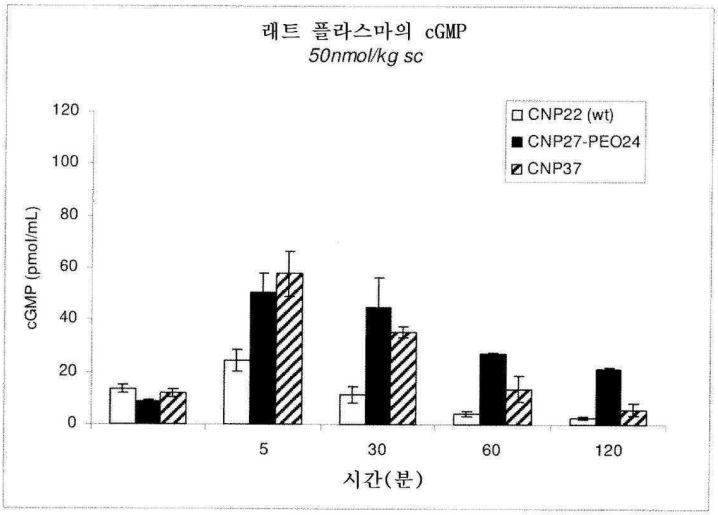
도면46


피하 투여
50 nmol/kg (rats)
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
플라스마 농도(pmol/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
50
100
150
200
시간(분)

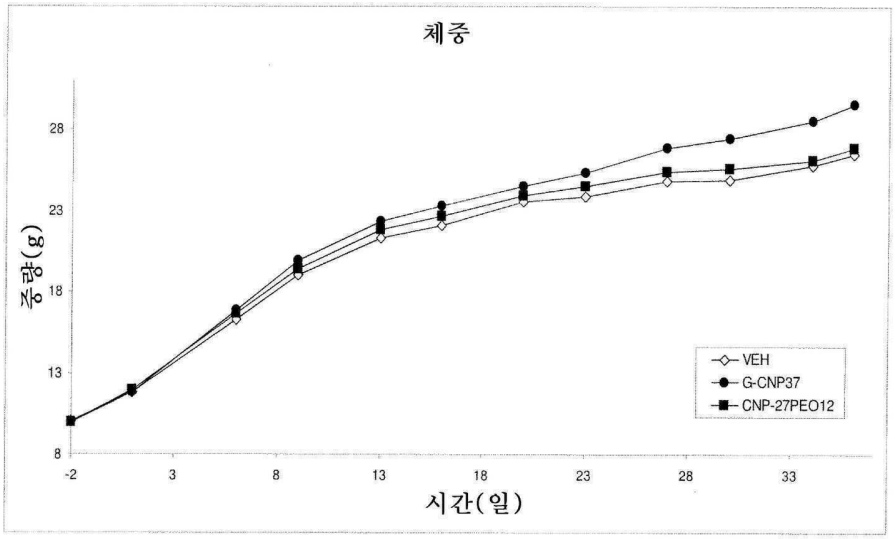
도면47


래트 플라스마의 cGMP
20nmol/kg iv
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
cGMP (pmol/mL)
120
100
80
60
40
20
0
5
30
60
90
시간(분)

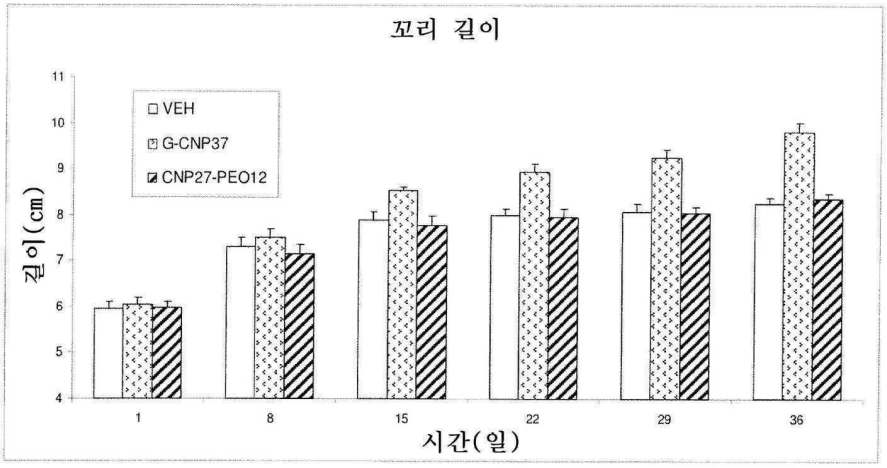
도면48


래트 플라스마의 cGMP
50nmol/kg sc
CNP22 (wt)
CNP27-PEO24
CNP37
cGMP (pmol/mL)
120
100
80
60
40
20
0
5
30
60
120
시간(분)

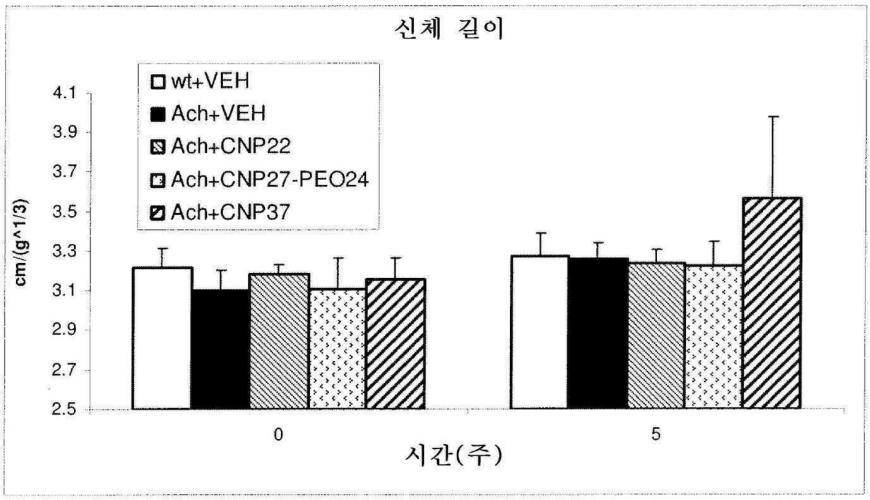
도면49



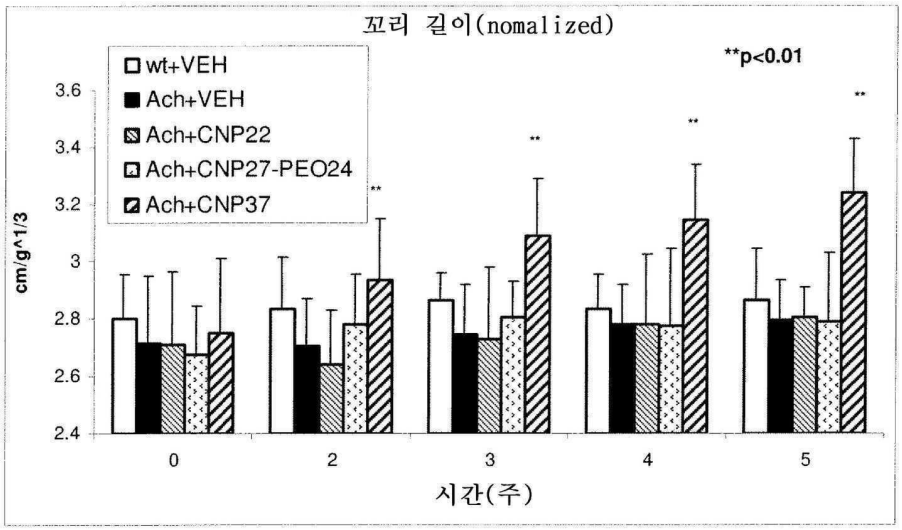
도면50



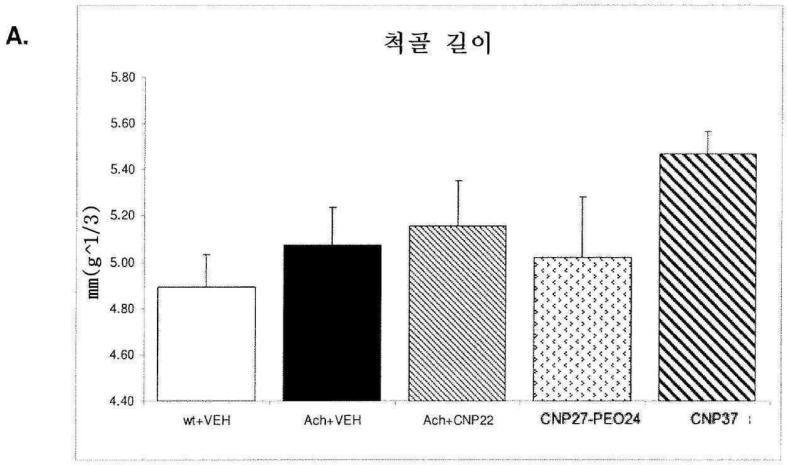
도면51

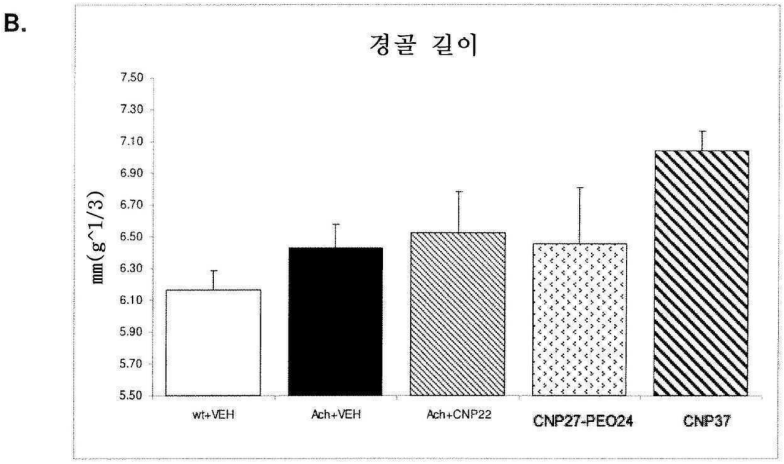


도면52


꼬리 길이(nomalized)
**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
시간(주)

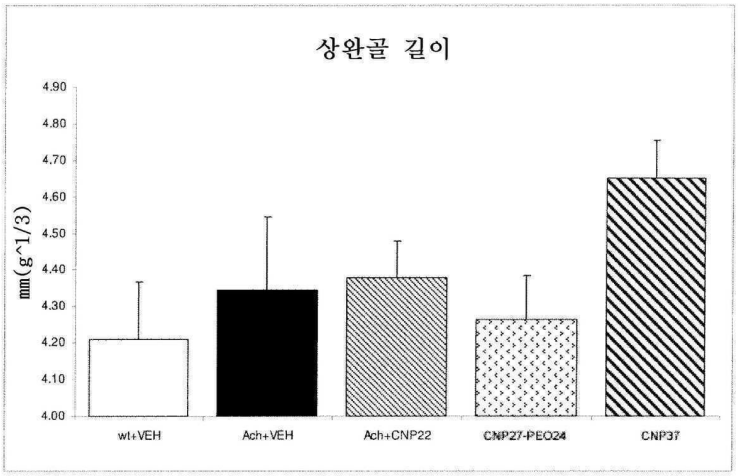
도면53


A.
척골 길이
mm(g^1/3)
5.80
5.60
5.40
5.20
5.00
4.80
4.60
4.40
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

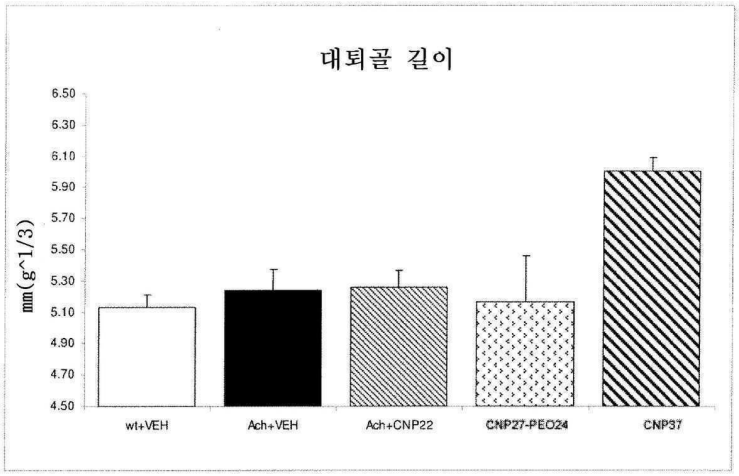

B.
경골 길이
mm(g^1/3)
7.50
7.30
7.10
6.90
6.70
6.50
6.30
6.10
5.90
5.70
5.50
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

도면54

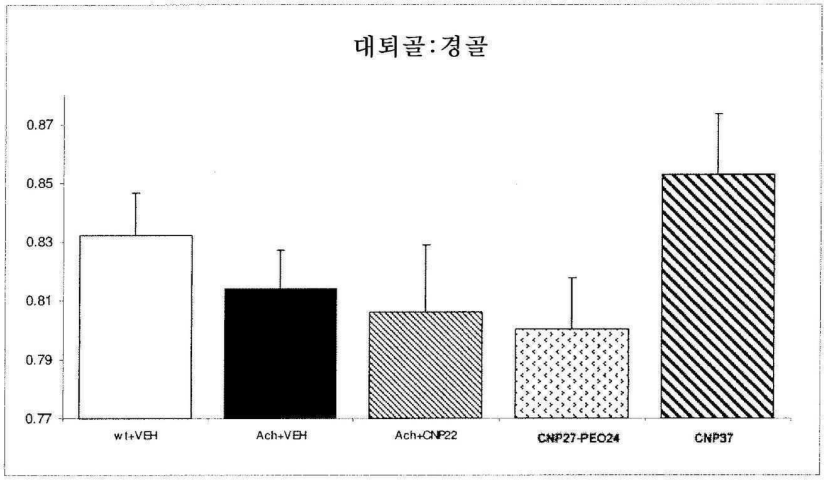
A.


상완골 길이
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

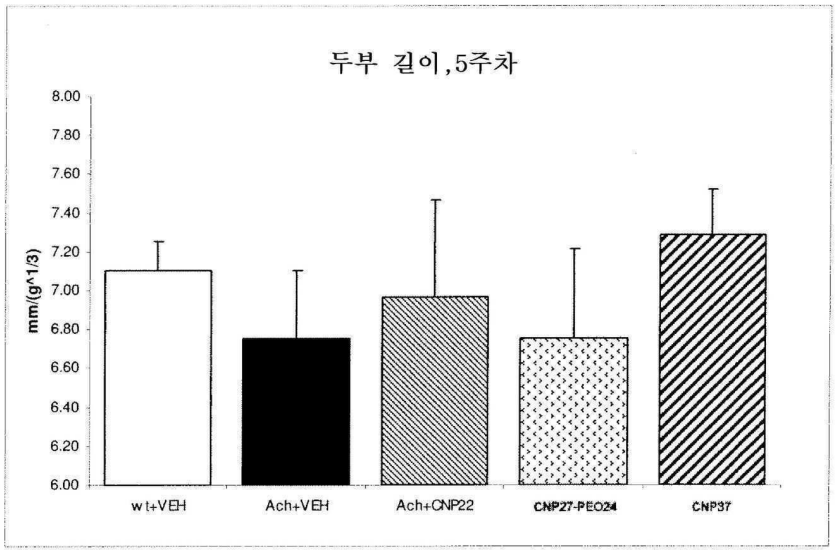
B.


대퇴골 길이
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

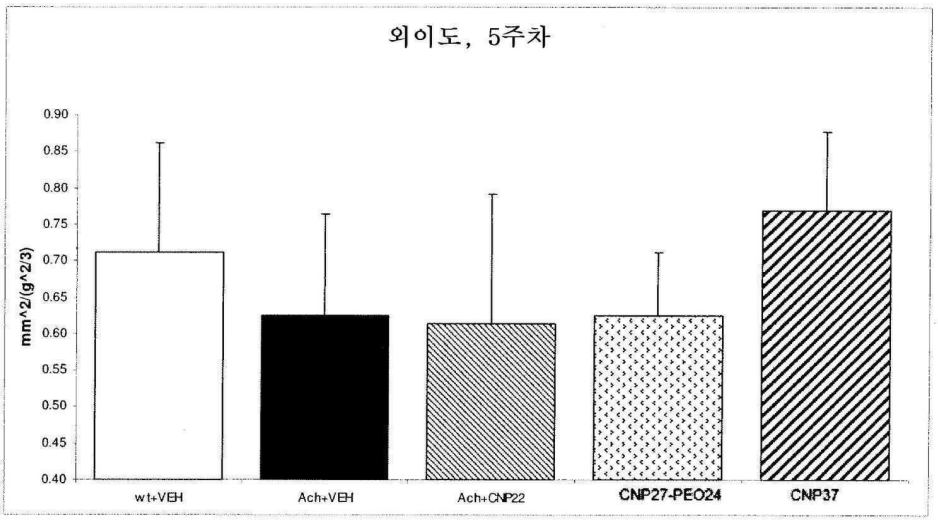
도면55


대퇴골:경골
0.87
0.85
0.83
0.81
0.79
0.77
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

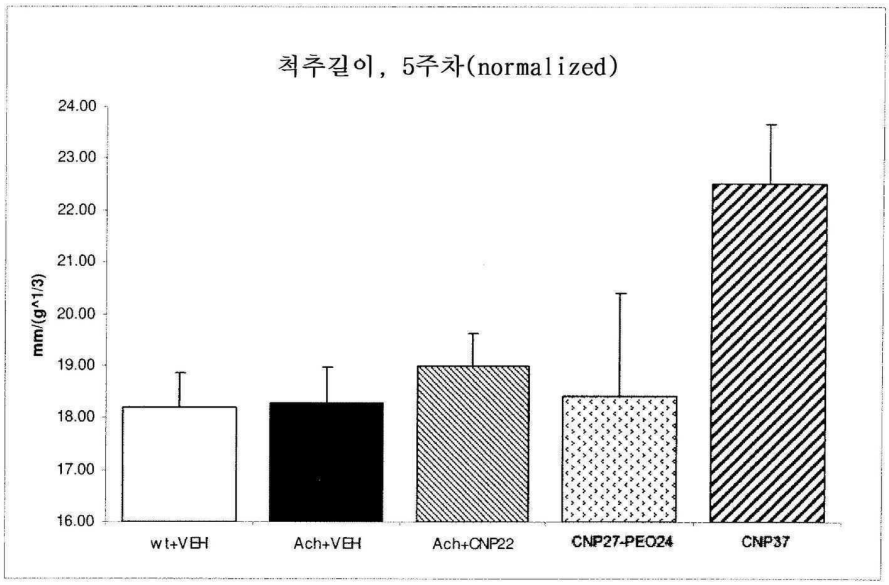
도면56


두부 길이,5주차
8.00
7.80
7.60
7.40
7.20
7.00
6.80
6.60
6.40
6.20
6.00
mm/(g^1/3)
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

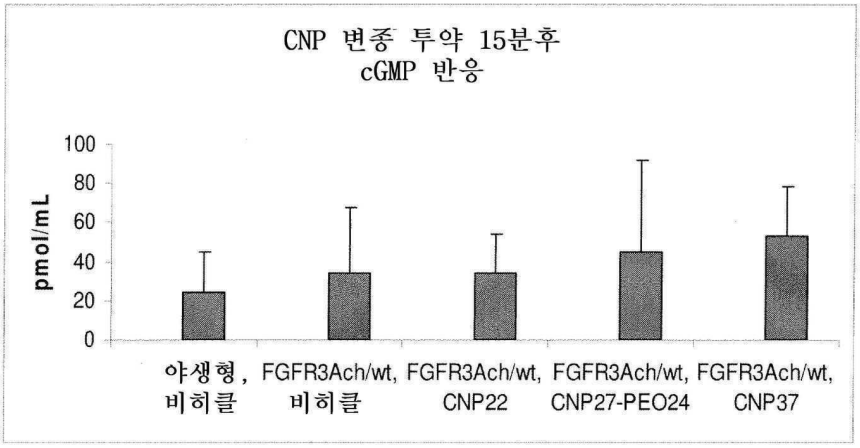
도면57


외이도, 5주차
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
mm^2/(g^2/3)
wt+VEH
Ach+VEH
Ach+CNP22
CNP27-PEO24
CNP37

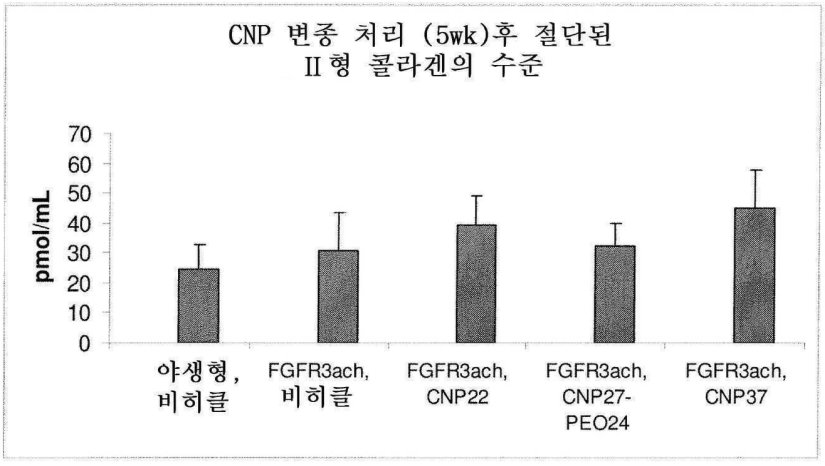
도면58



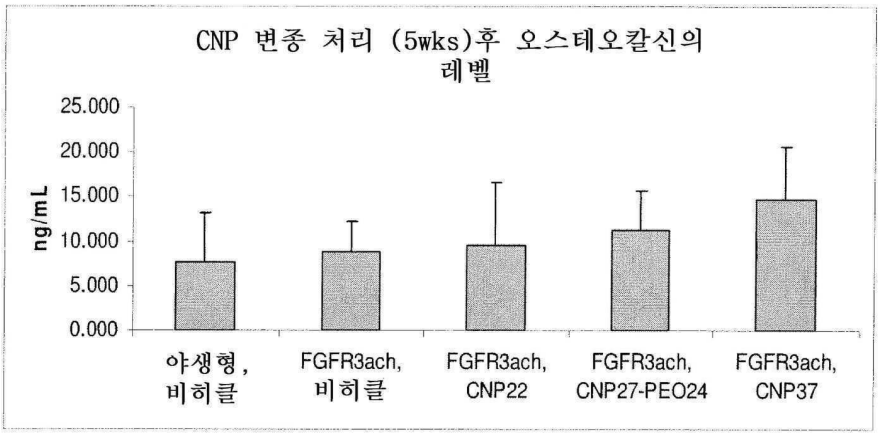
도면59



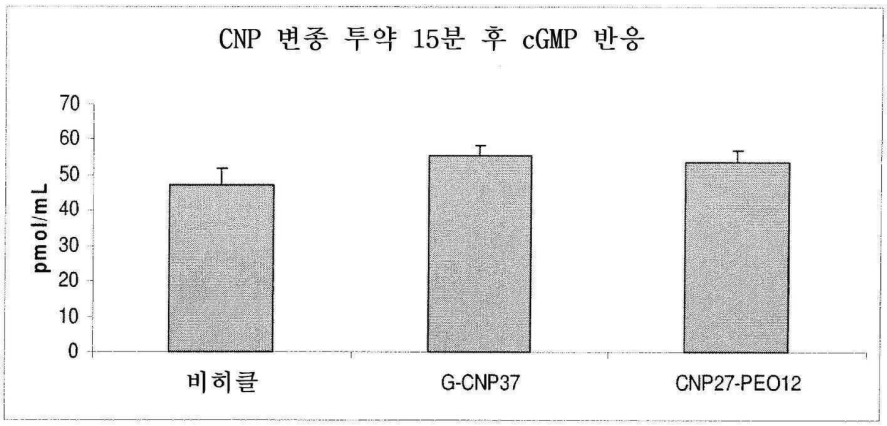
도면60



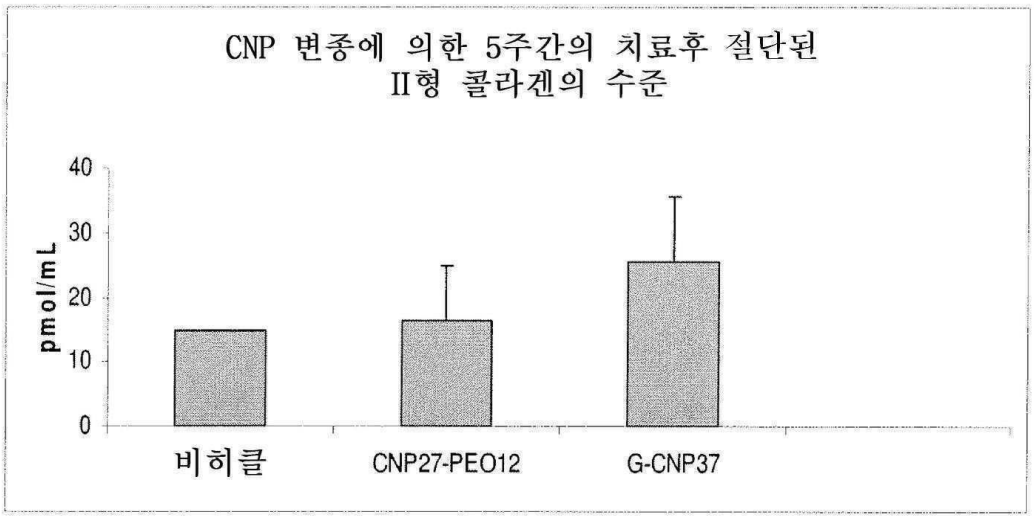
도면61



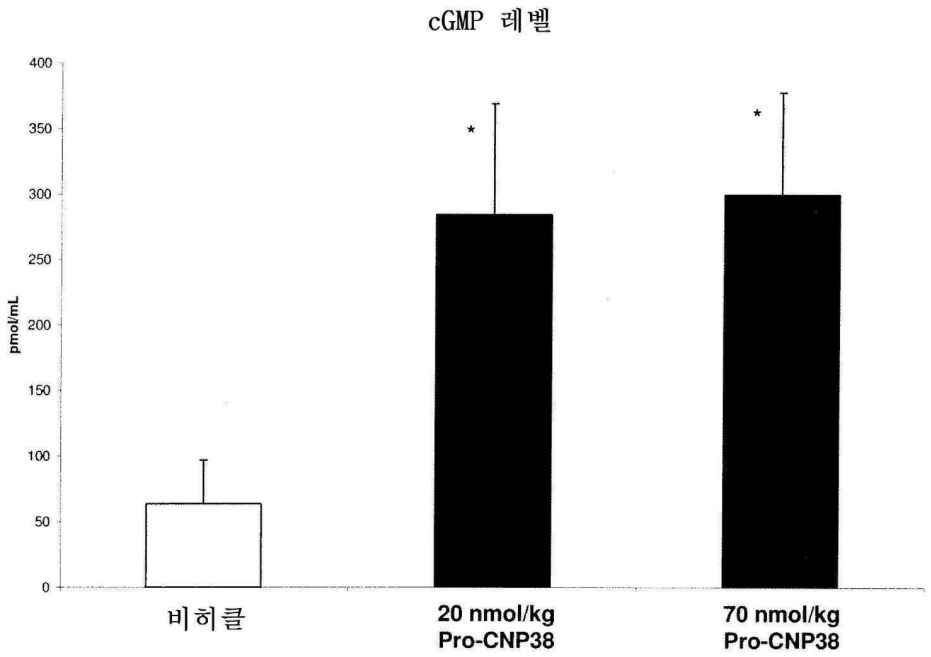
도면62



도면63

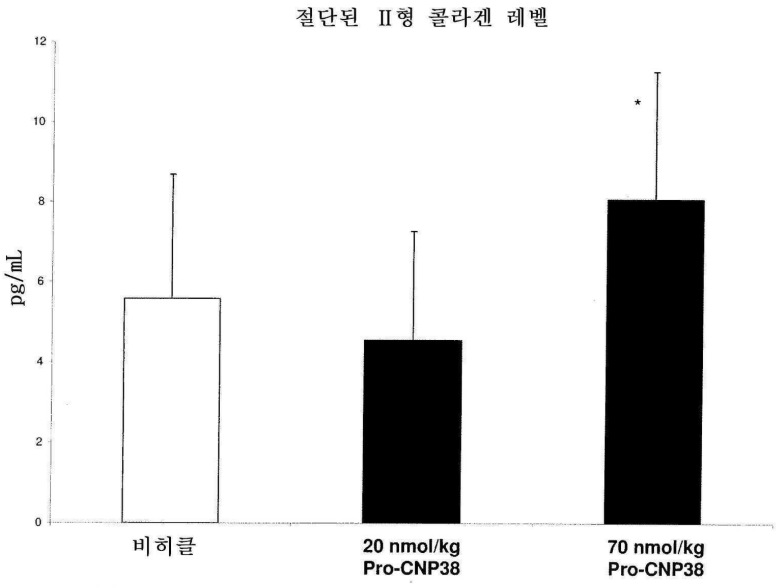


도면64



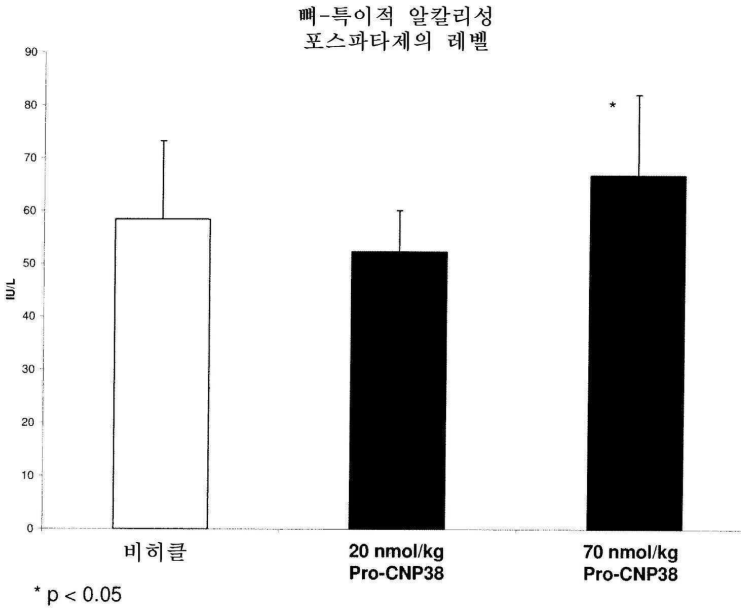
* p < 0.05

도면65

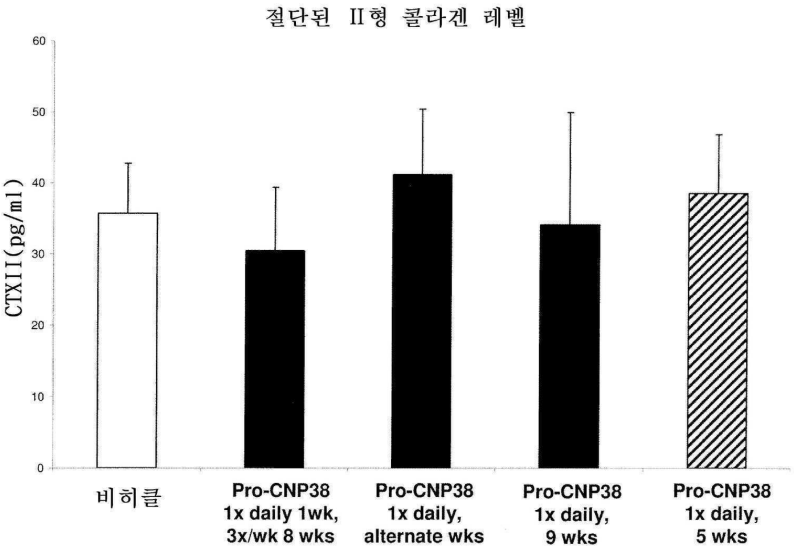


* p < 0.05

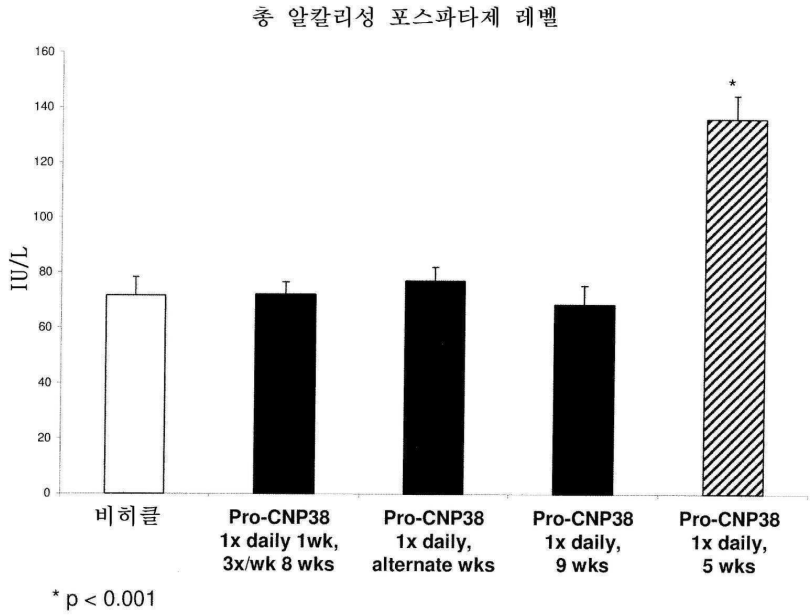
도면66


뼈-특이적 알칼리성
포스파타제의 레벨
IU/L
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
비히클
20 nmol/kg
Pro-CNP38
70 nmol/kg
Pro-CNP38
* p < 0.05

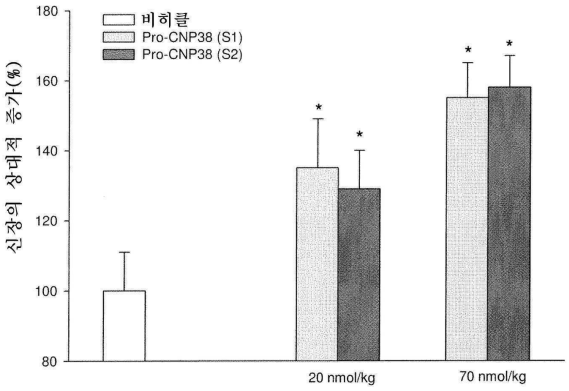
도면67


절단된 II형 콜라겐 레벨
CTXII(pg/ml)
60
50
40
30
20
10
0
비히클
Pro-CNP38
1x daily 1wk,
3x/wk 8 wks
Pro-CNP38
1x daily,
alternate wks
Pro-CNP38
1x daily,
9 wks
Pro-CNP38
1x daily,
5 wks

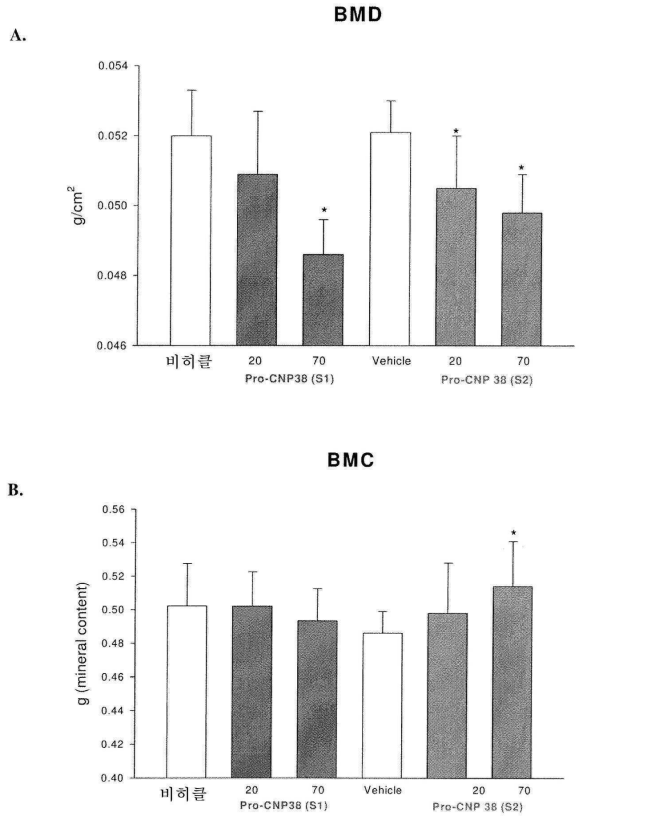
도면68


총 알칼리성 포스파타제 레벨
IU/L
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
비히클
Pro-CNP38 1x daily 1wk, 3x/wk 8 wks
Pro-CNP38 1x daily, alternate wks
Pro-CNP38 1x daily, 9 wks
Pro-CNP38 1x daily, 5 wks
* p < 0.001

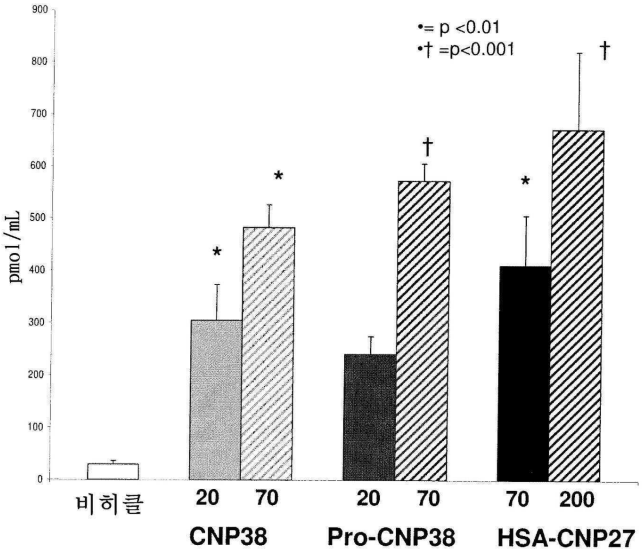
도면69


신장의 상대적 증가(%)
180
160
140
120
100
80
비히클
Pro-CNP38 (S1)
Pro-CNP38 (S2)
*
20 nmol/kg
70 nmol/kg

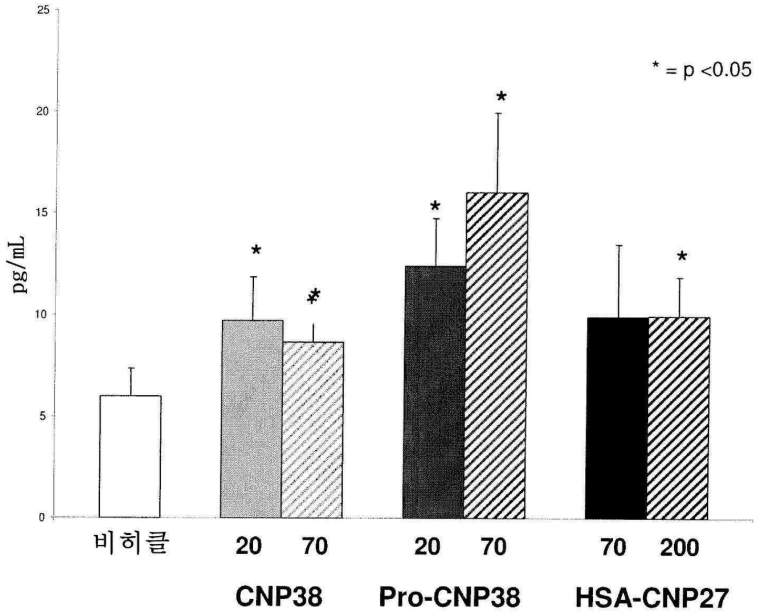
도면70


BMD
A.
0.054
0.052
0.050
0.048
0.046
g/cm2
비히클
20
70
Pro-CNP38 (S1)
Vehicle
20
70
Pro-CNP 38 (S2)
BMC
B.
0.56
0.54
0.52
0.50
0.48
0.46
0.44
0.42
0.40
g (mineral content)
비히클
20
70
Pro-CNP38 (S1)
Vehicle
20
70
Pro-CNP 38 (S2)

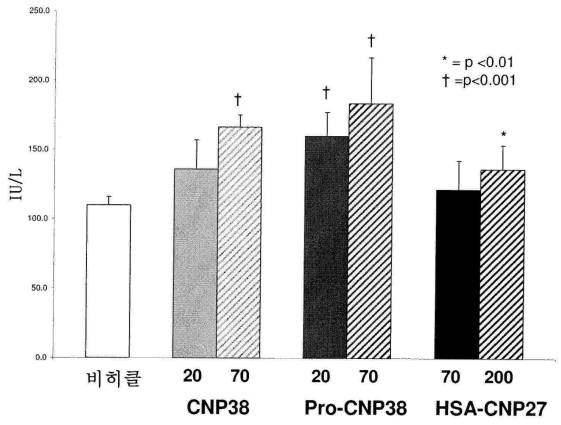
도면71


•= p <0.01
•† =p<0.001
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
pmol/mL
비히클
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

도면72

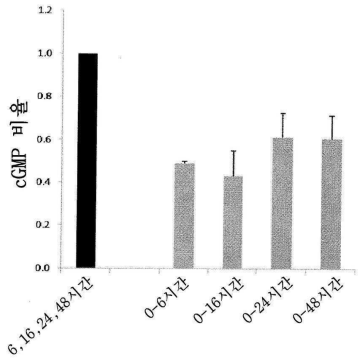

* = p <0.05
pg/mL
25
20
15
10
5
0
비히클
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

도면73

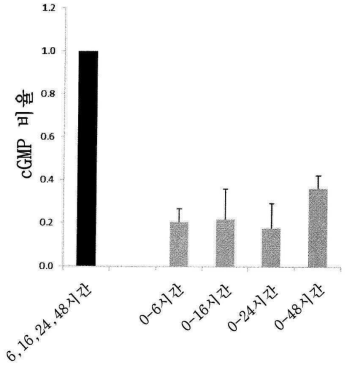

* = p <0.01
† =p<0.001
IU/L
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
비히클
20
70
20
70
70
200
CNP38
Pro-CNP38
HSA-CNP27

도면74

A.

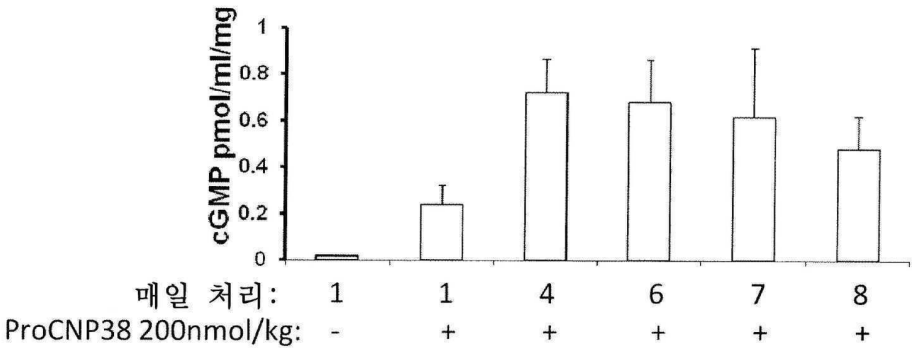

cGMP 비율
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6,16,24,48시간
0-6시간
0-16시간
0-24시간
0-48시간

B.

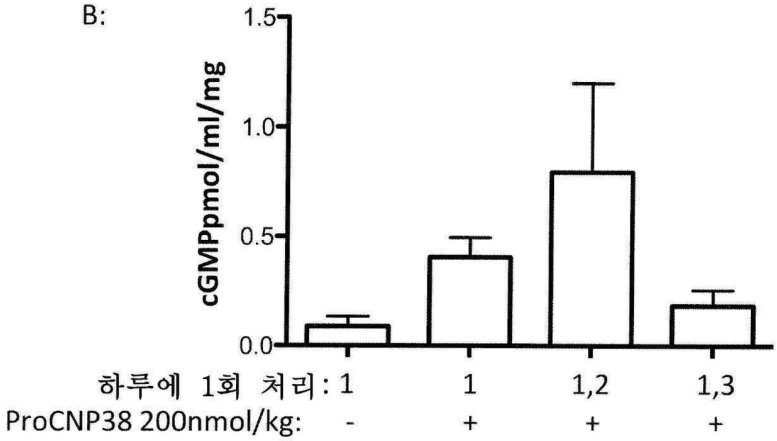

cGMP 비율
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6,16,24,48시간
0-6시간
0-16시간
0-24시간
0-48시간

도면75

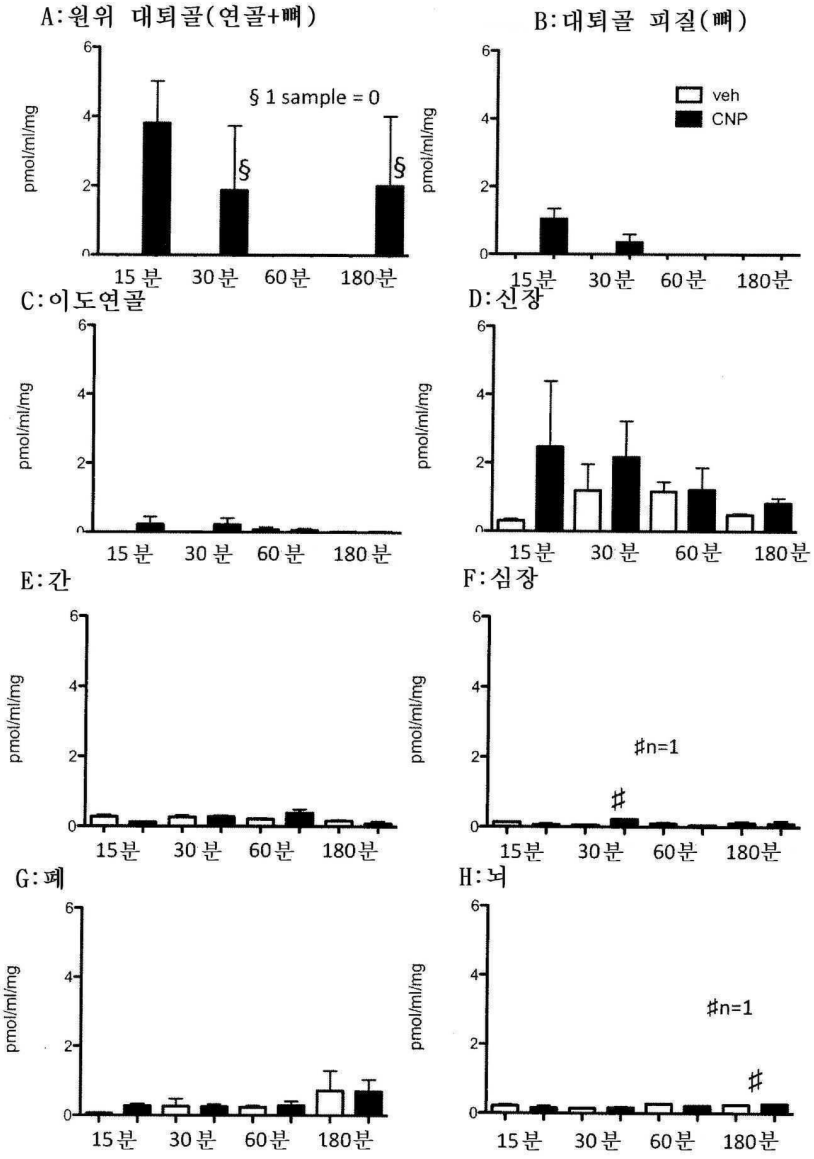
A:


cGMP pmol/ml/mg
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
매일 처리: 1 1 4 6 7 8
ProCNP38 200nmol/kg: - + + + + +

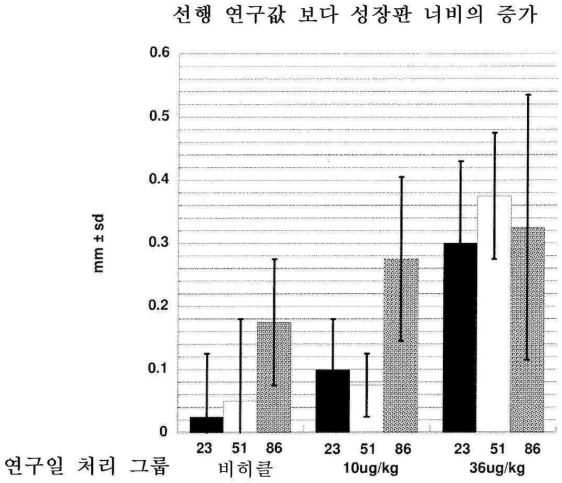
B:


cGMPpmol/ml/mg
1.5
1.0
0.5
0.0
하루에 1회 처리: 1 1 1,2 1,3
ProCNP38 200nmol/kg: - + + +

도면76

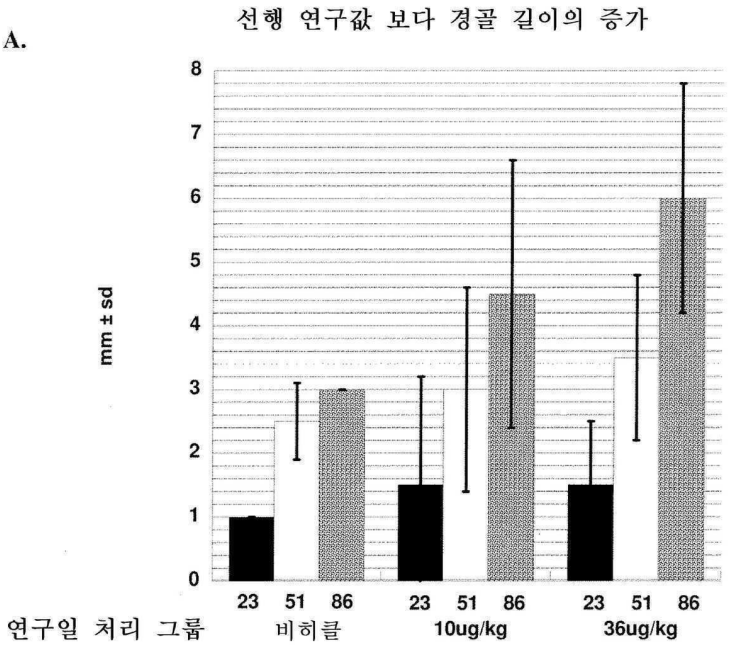

A:원위 대퇴골(연골+뼈)
§ 1 sample = 0
B:대퇴골 피질(뼈)
veh
CNP
C:이도연골
D:신장
E:간
F:심장
#n=1
G:폐
H:뇌
#n=1
pmol/ml/mg
15분
30분
60분
180분

도면77

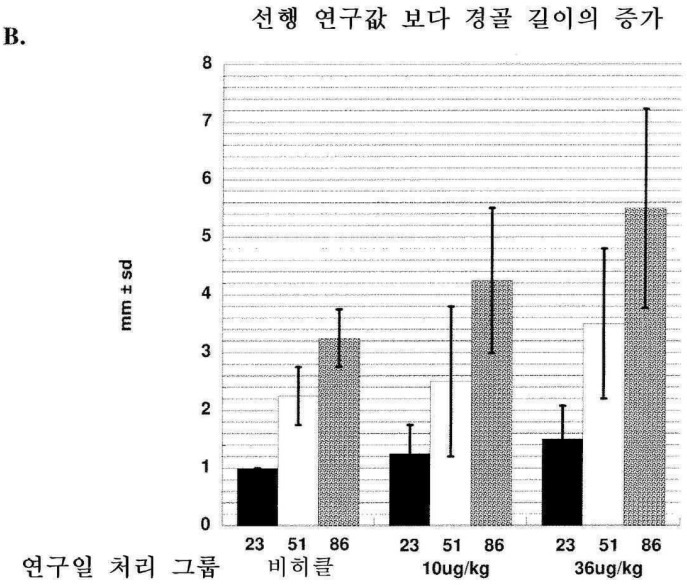

선행 연구값 보다 성장판 너비의 증가
mm ± sd
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
23 51 86
23 51 86
23 51 86
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

도면78

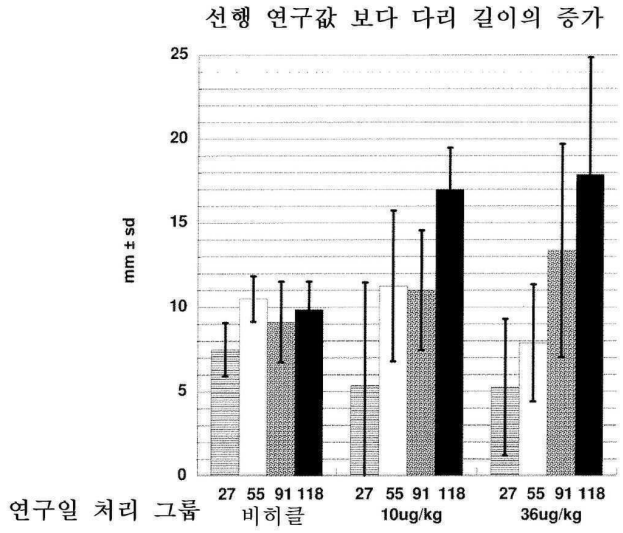
A.


선행 연구값 보다 경골 길이의 증가
mm ± sd
0
1
2
3
4
5
6
7
8
23 51 86 23 51 86 23 51 86
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

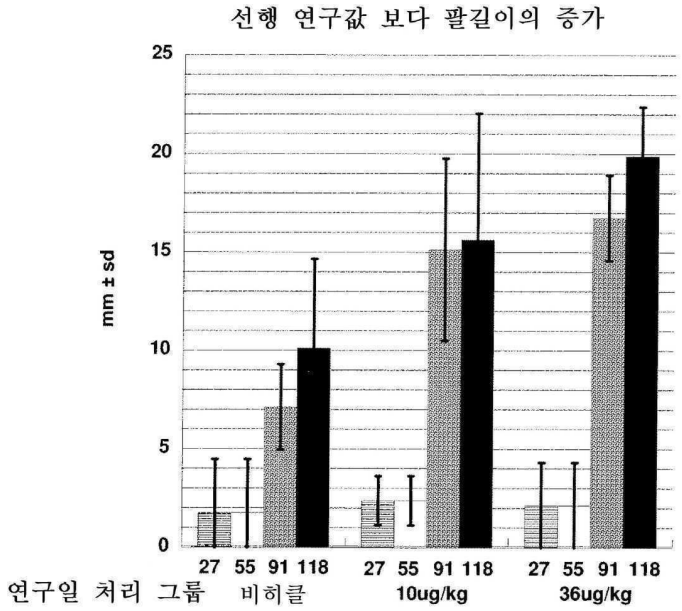
B.


선행 연구값 보다 경골 길이의 증가
mm ± sd
0
1
2
3
4
5
6
7
8
23 51 86 23 51 86 23 51 86
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

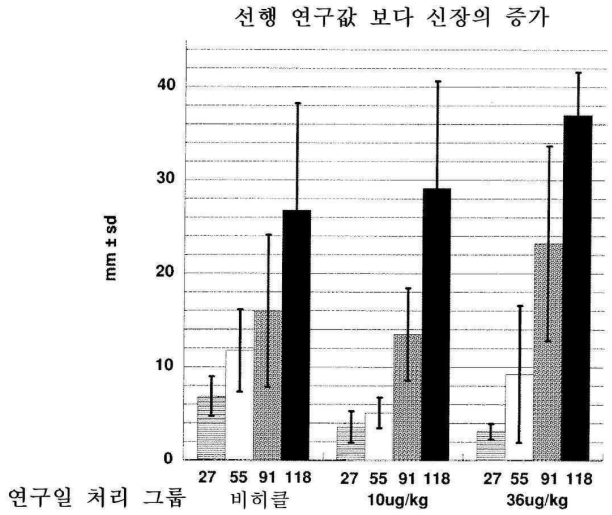
도면79


선행 연구값 보다 다리 길이의 증가
mm ± sd
25
20
15
10
5
0
27 55 91 118 27 55 91 118 27 55 91 118
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

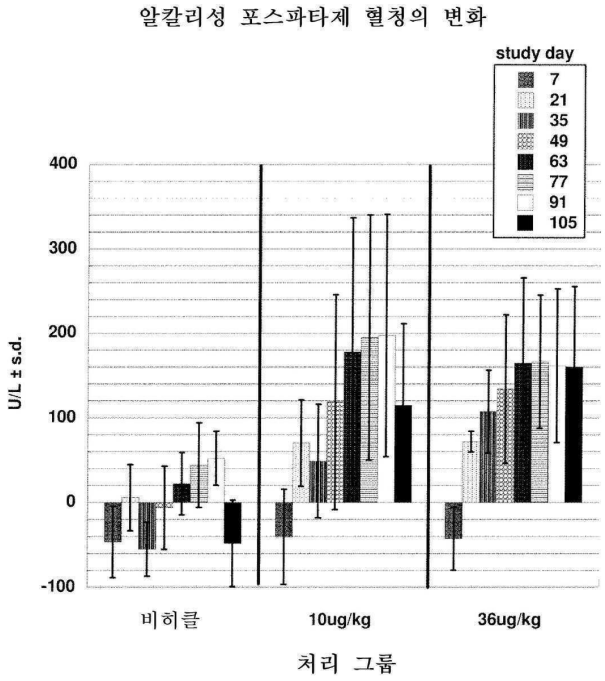
도면80


선행 연구값 보다 팔길이의 증가
mm ± sd
25
20
15
10
5
0
27 55 91 118 27 55 91 118 27 55 91 118
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

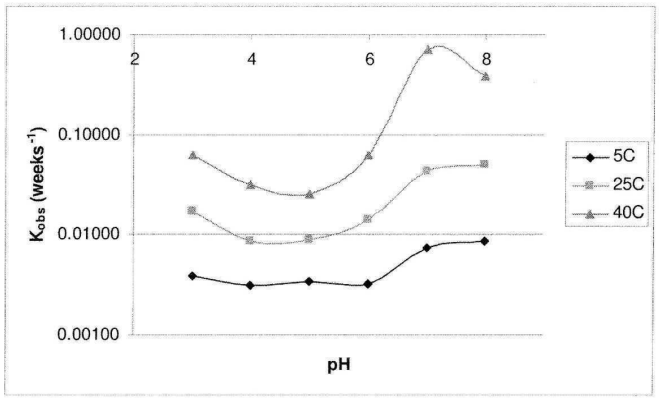
도면81


선행 연구값 보다 신장의 증가
mm ± sd
0
10
20
30
40
27 55 91 118
27 55 91 118
27 55 91 118
연구일 처리 그룹
비히클
10ug/kg
36ug/kg

도면82


알칼리성 포스파타제 혈청의 변화
study day
7
21
35
49
63
77
91
105
U/L ± s.d.
400
300
200
100
0
-100
비히클
10ug/kg
36ug/kg
처리 그룹

도면83



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BioMarin Pharmaceutical Inc.

Wendt, et al.

<120> Variants of C-Type Natriuretic Peptide

<130> 30610/44556P2

<160> 237

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> wtCNP-22

<220><221> DISULFID

<222> (6)..(22)

<223> Cysteines in positions 6 and 22 form cyclic domain via disulfide

bond

<400> 1

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP-17

<400> 2

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys

<

210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP-27

<400> 3

Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 4

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223>

CNP-53

<400> 4

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
20 25 30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met
35 40 45

Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with an amino acid sequence derived from a natriuretic polypeptide, a non-natriuretic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with an amino acid sequence derived from a natriuretic polypeptide, a non-natriuretic polypeptide

<400> 5

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is modified with a synthetic or natural polymeric group or combination thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid or peptidomimetic that does not have a reactive primary amine on a side chain, Arg, Gly,

6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Glu or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid or peptidomimetic that does not have a reactive primary amine on a side chain, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Glu or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with a synthetic or natural polymeric group or combination thereof

<400> 6

Gly Leu Ser Xaa Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Gly Ala Asn Lys Lys
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

Gly Ala Asn Arg Arg

1 5

<210

> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 9

Gly Ala Asn Pro Arg

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 10

Gly Ala Asn Gln Gln

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 11

Gly Ala Asn Ser Ser

1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 12

Gly Ala Asn Arg Gln

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 13

Gly Ala Asn Arg Met

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 14

Gly Ala Asn Arg Thr

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400

> 15

Gly Ala Asn Arg Ser

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 16

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 17

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg

1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 18

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 19

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 20

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Arg Arg

1 5 10 15

<210> 21

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 21

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu

1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

20 25 30

<210> 22

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 22

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu

1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Arg Arg

20 25 30

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 23

Ser Leu Arg Arg Ser Ser

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 24

Asn Ser Phe Arg Tyr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 25

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 26

Met Val Gln Gly Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 27

Lys Val Leu Arg Arg Tyr

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 28

Lys Val Leu Arg Arg His

1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 29

Gly Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg

1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 30

Gly Val Pro Gln Val Ser Thr Ser Thr

1 5

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 31

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln

1 5 10 15

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 32

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Amino acid extention

<400> 33

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

<210> 34

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP-22 with amino acid extention

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Glu or Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Glu or Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Cys is optionally modified with a synthetic, natural or

combination polymeric group

<400> 34

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly

1 5 10 15

Leu Ser Xaa Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP22 (K4R)

<400> 35

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANRR-CNP22(K4R) - CNP27(Arg4)

<400> 36

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 37

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANPR-CNP22(K4R) - CNP27(Pro4) - Analog CI

<400> 37

Gly Ala Asn Pro Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> ER-CNP22

<400> 38

Glu Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
1 5 10 15

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 39

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220

><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BA - ER-CNP22(K4R)

<400> 39

Glu Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile
1 5 10 15

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> R-CNP22

<400> 40

Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AZ - R-CNP22(K4R)

<400> 41

Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP22 (K4R)(K10R)

<400> 42

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 43

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP-22 (Cys6-Phe7 variable bond)

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH2-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -C(=O)-N(R)-

where R is methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, cyclopropyl,

n-butyl, isobutyl, sec-butyl or tert-butyl

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -C(=O)-NH-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH2-S-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH2-S(O)n

where n is 1 or 2

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH2-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH=CH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -C(=O)-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH(CN)-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -CH(OH)-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with -O-C(=O)-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Cys6-Phe7 peptide bond (-C(=O)-NH-) replaced with NHC(=O)NH-

<400> 43

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 44

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is 3-amino-2-phenylpropionic acid or D-Phe

<400> 44

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> CNP22 - modified Cys6

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Cys, homocysteine, penicillamine, 2-mercaptopropionic

acid, or 3-mercaptopropionic acid.

<400> 45

Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 46

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with a bone or cartilage targeting

compound, a biphosphonate, polyAsp, polyGlu, osteopontin,

osteocalcin, or sialoprotein peptides, polymers, PEG,

carbohydrates, hydrophobic acids, or amino acids

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any

natural or unnatural amino acid or peptidomimetic that does not have a reactive primary amine on a side chain, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser, or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Xaa is Cys with peptide bond isosteres between positions 6 and 7

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is L-Phe, D-Phe, 3-amino-2-phenylpropionic acid, or N-alkylated derivatives of Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gly, tert-butyl-Gly (tBu-Gly), Thr, Ser, Val or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Leu, Ser, Thr or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine,

citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Leu or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Ile, tBu-Gly and peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-aminobutyric acid (Abu) or 2-amino-isobutyric acid (Aib)

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Leu, norleucine (Nle), homoleucine (Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with a bone or cartilage targeting compound, a bisphosphonate, polyAsp, polyGlu, osteopontin, osteocalcin or sialoprotein peptides, or amino acid sequences derived from non-CNP polypeptides

<400> 46

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Gly Ser
1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys
20

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with a peptide sequence containing one to five amino acids from a natriuretic or non-natriuretic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with a peptide sequence containing one to five amino acids from a natriuretic or non-natriuretic polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any

natural or unnatural amino acid or peptidomimetic, Arg, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser, or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Cys or decarboxy Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with -CH2-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-C(=O)-N(R)- where R is methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, cyclopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl or tert-butyl

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with -C(=O)-NH-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with -CH2-S-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with -CH2-S(O)n where n is 1 or 2

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with -CH2-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-CH=CH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-C(=O)-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-CH(CN)-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-CH(OH)-CH2-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-O-C(=O)-NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(7)

<223> Peptide bond between positions 6 and 7 may be replaced with

-NHC(=O)NH-

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is L-Phe, D-Phe, 3-amino-2-phenylpropionic acid, or

N-alkylated derivatives of Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gly, tert-butyl-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Leu, Ser, Thr or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Leu or peptide isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Ile, tBu-Gly or peptide isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-aminobutyric acid (Abu) or 2-amino-isobutyric acid (Aib)

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Leu, norleucine (Nle), homoleucine (Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg, or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with a synthetic bone targeting compound, a bisphosphonate, polyAsp, polyGlu, osteopontin,

osteocalcin or sialoprotein peptides, or charged PEG molecules

<400> 47

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Gly Ser
1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys
20

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is a synthetic or natural polymeric group or combination thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is absent or may be one or more amino acids from Gly-Leu-Ser-Lys-Gly and/or substitutions at one or more of these positions

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Lys, a conservative amino acid substitution, any natural or unnatural amino acid or peptidomimetic that does have a reactive primary amine on a side chain

<220><221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Cys is optionally modified with a synthetic or natural polymeric group or a combination thereof

<400> 48

Xaa Xaa Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gly Cys

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is absent or may be a peptide fragment or water soluble polymer

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Cys or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is L-Phe, D-Phe, 3-amino-2-phenylpropionic acid or
N-alkylated derivatives of Phe
<220><221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Gly, tert-butyl-Gly (tBu-Gly), Val, Ser, Thr or Asn
<220><221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is Leu, Ser, Thr or N-Me-Leu
<220><221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any
natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine,

citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu
<220><221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Xaa is Leu and peptide bond isosteres thereof
<220><221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Xaa is Ile, tBu-Gly or peptide bond isosteres thereof
<220><221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Xaa is Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-aminobutyric acid (Abu) or
2-amino-isobutyric acid (Aib)
<220><221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Xaa is Leu, norleucine (Nle), homoleucine (Hleu), Val,
tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Ser, Thr, Arg or peptide bond isosteres

thereof
<220><221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Cys is optionally modified with amino acid sequences useful in bone/cartilage targeting, polyAsp or polyGlu, osteopontin, osteocalcin, sialoprotein or sequences derived from NPPC or non-CNP polypeptides

<400> 49

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Gly Ser Xaa Ser Gly Xaa
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 50

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with bone targeting compound, moieties to reduce renal clearance, charged PEG molecules or hydrophilic polymers

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Cys or peptide isosteres between positions 6 and 7

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is L-Phe, D-Phe, 3-amino-2-phenylpropionic acid or N-alkylated derivatives of Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gly, tert-butyl-Gly, Thr, Ser, Val or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Leu, Ser, Thr or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any

natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Leu, Asn or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Ile, tert-butyl-Gly (tBu-Gly), Asn or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Gly, Arg, Ser or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Met, Val, Asn, beta-Cl-Ala, 2-aminobutyric acid (Abu) or

2-amino-isobutyric acid (Aib)

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Leu, norleucine (Nle), homoleucine (Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser or peptide bond isoteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with bone targeting compound, moieties to reduce renal clearance, charged PEG molecules or hydrophilic

polymers

<400> 50

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Xaa Ser

1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys

20

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Arg or Glu

<400> 51

Xaa Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 52

<211> 22

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Arg, Gln or Ser

<400> 52

Gly Leu Ser Lys Xaa Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Ser, Asn, Arg, or Cit

<400> 53

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Xaa Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is Ser, Arg, or Asn

<400> 54

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Xaa Leu Gly Cys

20

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is Ser, Thr, or Arg

<400> 55

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Xaa Cys

20

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog A

<220><221> BINDING

<222> (6)..(6)

<223> CH2NH

<400> 56

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analogs B

<220><221> BINDING

<222> (7)..(7)

<223> Xaa replaced with N-Me-Phe

<400> 57

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog F

<220><221> BINDING

<222> (8)..(8)

<223> tBu

<400> 58

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog H

<220><221> BINDING

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is replaced with NHCH2-CH(Phe)CO

<400> 59

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 60

<211> 37

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BL - CNP37

<400> 60

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

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

Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 61

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CA

<400> 61

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Gly Leu Ser
1 5 10 15

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

Leu Gly Cys
35

<210> 62

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CB

<400> 62

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Gly Leu

1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Cys

35

<210> 63

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CC

<400> 63

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Gly Leu

1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Cys

35

<210> 64

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANQQ-CNP22

<400> 64

Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 65

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANRR-CNP22

<400> 65

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 66

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANPR-CNP22

<400> 66

Gly Ala Asn Pro Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 67

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANSS-CNP22

<400> 67

Gly Ala Asn Ser Ser Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequene

<220><223> Sythetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CD

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminus BNP tail

<220><221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> N-terminus BNP tail

<

400> 68

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp

1 5 10 15

Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His

20 25 30

<210> 69

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANQQ-CNP22(K4R) - Analog CH

<400> 69

Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 70

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> GANSS-CNP22(K4R) - Analog CG

<400> 70

Gly Ala Asn Ser Ser Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 71

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CS

<400> 71

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Pro Lys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 72

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CT

<400> 72

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

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 73

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CU

<400> 73

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

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 74

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CW

<400> 74

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

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 75

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400

> 75

Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 76

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CQ

<400> 76

Gly His His Ser His Glu Gln His Pro His Gly Ala Asn Gln Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 77

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CR

<400> 77

Gly Ala His His Pro His Glu His Asp Thr His Gly Ala Asn Gln Gln

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 78

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequencce

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CX

<400> 78

Gly His His Ser His Glu Gln His Pro His Gly Ala Asn Pro Arg Gly

1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 79

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CF

<400> 79

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gly Leu

1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Cys

35

<210> 80

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CY

<400> 80

Gly Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Gly Ala Asn Pro

1 5 10 15

Arg Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 81

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CE

<400> 81

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 82

<211> 35

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CZ

<400> 82

Phe Gly Ile Pro Met Asp Arg Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gly Leu Ser
1 5 10 15

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

Leu Gly Cys
35

<210> 83

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog DA

<400> 83

Gly Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly
1 5 10 15

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

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 84

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CK

<400> 84

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Gly Ala Asn Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 85

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CL

<400> 85

Gly Val Pro Gln Val Ser Thr Ser Thr Gly Ala Asn Gln Gln Gly Leu

1 5 10 15

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

Gly Leu Gly Cys
35

<210> 86

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CM

<400> 86

Gly Gln Pro Ser Ser Ser Ser Gln Ser Thr Gly Ala Asn Gln Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 87

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CN

<400> 87

Gly Gln Thr His Ser Ser Gly Thr Gln Ser Gly Ala Asn Gln Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 88

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CO

<400> 88

Gly Ser Thr Gly Gln Trp His Ser Glu Ser Gly Ala Asn Gln Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 89

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CP

<400> 89

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala Asn Gln Gln Gly

1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

20 25 30

Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with bone targeting compound, a bisphosphonates, polyAsp, polyGlu, osteopontin, osteocalcin, or sialoprotein peptides, negatively charged PEG molecules or natural polymers

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Cys or another natural or unnatural amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Phe or another natural or unnatural amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gly, a larger natural or unnatural amino acid or peptidomimetic

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with bone targeting compound, a bisphosphonates, polyAsp, polyGlu, osteopontin, osteocalcin, or sialoprotein peptides, negatively charged PEG molecules or natural polymers

<400> 90

Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Xaa Xaa Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog J

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is CH2-NH

<220><221> BINDING

<222> (9)..(9)

<223> N-Me

<220><221> BINDING

<222> (20)..(20)

<223> N-Me

<400> 91

Gly Leu Ser Lys Gly Xaa Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog K

<220><221> BINDING

<222> (9)..(9)

<223> N-Me

<220><221> BINDING

<222> (20)..(20)

<223> N-Me

<400> 92

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 93

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog L

<220><221> BINDING

<222> (9)..(9)

<223> N-Me

<220><221> BINDING

<222> (11)..(11)

<223> N-Me

<220><221> BINDING

<222> (20)..(20)

<223> N-Me

<400> 93

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 94

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog M

<220><221> BINDING

<222> (9)..(9)

<223> N-Me

<220><221> BINDING

<222> (11)..(11)

<223> N-Me

<400> 94

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 95

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog Z

<400> 95

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Tyr Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 96

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AA

<400> 96

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Val Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 97

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AB

<400> 97

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Ser Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 98

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AC

<400> 98

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Thr Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 99

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AD

<400> 99

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Thr Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 100

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AE

<400> 100

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Arg Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog AF

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Cit

<400> 101

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Xaa Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 102

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AG

<400> 102

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Val Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 103

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AJ

<400> 103

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Val Gly Cys

20

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AK

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is tBu-Ala

<400> 104

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Xaa Gly Cys

20

<210> 105

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AT

<400> 105

Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AV

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminus modified with pentanoic acid

<400> 106

Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog AW

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Heptanoic acid modifying N-terminus

<400> 107

Glu Leu Ser Glu Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 108

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BB

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminus modified with heptanoic acid

<400> 108

Glu Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 109

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BC

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminus modified with pentanoic acid

<400> 109

Glu Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 110

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BF

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Cit

<400> 110

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 111

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BG

<400> 111

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Gln Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 112

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BH

<400> 112

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 113

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BJ

<400> 113

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Asn Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 114

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BK

<400> 114

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Ser Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 115

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog N

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> All D-amino acids

<400> 115

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 116

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BD

<220><221> BINDING

<222> (9)..(9)

<223> N-Me

<400

> 116

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 117

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BN

<220><221> BINDING

<222> (11)..(11)

<223> N-Me

<400> 117

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 118

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BE

<220><221> BINDING

<222> (20)..(20)

<223> N-Me

<400> 118

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 119

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog V

<220><221> BINDING

<222> (7)..(7)

<223> 3,4-dichloro

<400> 119

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 120

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog X

<220><221> BINDING

<

222> (7)..(7)

<223> 3-methyl

<400> 120

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 121

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BP

<400> 121

Gly Leu Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 122

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BO

<400> 122

Gly Leu Ser Arg Arg Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog P

<400> 123

Gly Leu Ser Gly Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BY

<400> 124

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Ser Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 125

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BZ

<400> 125

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Gln

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 126

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog BX

<400> 126

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 127

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BQ

<400> 127

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Ser Leu Gly Cys

20

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BR

<400> 128

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Arg Leu Gly Cys

20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog BS

<400> 129

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Arg Gly Cys

20

<210> 130

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BT

<400> 130

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Ser Cys

20

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog BU

<400> 131

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Thr Cys

20

<210> 132

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221

> MISC_FEATURE

<223> Analog BW

<400> 132

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Arg Cys

20

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog CJ

<400> 133

Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Cys

1 5 10 15

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminal linked to CNP22 by disuccinimidyl glutarate

<400> 134

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220

><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-terminal linked to CNP22 by Bis-PEO5

<400> 135

Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Arg Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog E

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is D-Phe

<400> 136

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 137

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<223> Analog G

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is 3-Cl-Phe

<400> 137

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Xaa Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 138

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa comprises one or more amino acids selected from
Gly-Leu-Ser-Lys-Gly or substitutions at one or more of these
amino acids and further comprises a hydrophilic or water soluable
polymer

<400> 138

Xaa Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

1 5 10 15

Gly Cys

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Cys is modified with a natural and/or synthetic polymer

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Cys is modified with a natural and/or synthetic polymer

<400> 139

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys

<210> 140

<211> 22

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is modified with a natural and/or synthetic polymer

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is modified with a natural and/or synthetic polymer

<400> 140

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 141

<211> 17

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Cys is modified with a natural and/or synthetic polymeric group

or combination thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any

natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine,

citrulline (Cit), Gln, Glu or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Cys is optionally modified with a natural and/or synthetic

polymeric group or combination thereof

<400> 141

Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys

<210> 142

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is optionally modified with bone- or cartilage-targeting moieties, moieties that reduce renal clearance, hydrophilic polymers, carbohydrates, hydrophobic acids and combinations thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is absent or may comprise 1 to 5 amino acids from Gly-Leu-Ser-Lys-Gly, optionally substituted with a natural or unnatural amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Lys, any natural or unnatural amino acid or peptidomimetic that does not have a reactive primary amine on a side chain

<220><221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is optionally modified with bone- or cartilage-targeting moieties, moieties that reduce renal clearance, hydrophilic polymers, carbohydrates, hydrophobic acids and combinations thereof

<400> 142

Xaa Xaa Cys Phe Gly Leu Xaa Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gly Cys

<210> 143

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gly is optionally modified with cartilage or bone targeting

compounds, a bisphosphonate, polyAsp, polyGlu, osteopontin peptides, osteocalcin peptides, sialoprotein peptides, charged PEG molecules or hydrophilic polymers

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Cys or peptide isosteres between positions 6 and 7

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is L-Phe, D-Phe, N-alkylated Phe, or Phe analog

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Gly, tert-butyl-Gly, Thr, Ser, Val or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Leu, Ser, Thr or peptide bond isosteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Lys or a conservative amino acid substitution thereof, any natural or unnatural amino acid, Arg, Gly, 6-hydroxy-norleucine, citrulline (Cit), Gln, Ser or Glu

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Gly, Arg, Ser or Asn

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is Leu, norleucine (Nle), homoleucine (Hleu), Val, tert-butyl-Ala (tBu-Ala), Arg, Thr, Ser or peptide bond isoteres thereof

<220><221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Cys is optionally modified with cartilage or bone targeting compounds, a bisphosphonate, polyAsp, polyGlu, osteopontin peptides, osteocalcin peptides, sialoprotein peptides, charged PEG molecules or hydrophilic polymers

<400> 143

Gly Leu Ser Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Arg Xaa Xaa Ser
1 5 10 15

Xaa Ser Gly Xaa Gly Cys
20

<210> 144

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 144

Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys Lys
1 5 10 15

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 145

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 145

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> 146

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 146

Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln

1 5 10 15

Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu

20 25 30

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

35 40 45

Gly Leu Gly Cys

50

<210> 147

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 147

Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu

1 5 10 15

His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser

20 25 30

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly

35 40 45

Leu Gly Cys

50

<210> 148

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 148

Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His

1 5 10 15

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys

20 25 30

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

35 40 45

Gly Cys

50

<210> 149

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 149

Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro

1 5 10 15

Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly

20 25 30

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

35 40 45

Cys

<210> 150

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 150

Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn

1 5 10 15

Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys

20 25 30

Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35 40 45

<210> 151

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 151

Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala

1 5 10 15

Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe

20 25 30

Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35 40 45

<210> 152

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 152

Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg

1 5 10 15

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
20 25 30
Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40 45

<210> 153
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 153

Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys
1 5 10 15
Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu
20 25 30
Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40 45

<210> 154
<211> 44
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polypeptide
<400> 154

Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr
1 5 10 15
Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys
20 25 30

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 155
<211> 43
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 155

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

Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
20 25 30

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 156

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 156

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

Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp
20 25 30

Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 157

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 157

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

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

Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 158

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 158

Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn

1 5 10 15

Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile

20 25 30

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35 40

<210> 159

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 159

Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys

1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 160

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 160

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 161

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 161

Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu

1 5 10 15

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Cys

35

<210> 162

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 162

His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser

1 5 10 15

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly

20 25 30

Leu Gly Cys

35

<210> 163

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 163

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys
1 5 10 15

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

Gly Cys

<210> 164

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 164

Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly
1 5 10 15

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

Cys

<210> 165

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 165

Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys
1 5 10 15

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

<210> 166

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 166

Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe

1 5 10 15

Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25 30

<210> 167

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 167

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly

1 5 10 15

Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25 30

<210> 168

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 168

Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu

1 5 10 15

Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 169

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 169

Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys

1 5 10 15

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 170

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 170

Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 171

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 171

Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp

1 5 10 15

Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 172

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 172

Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg

1 5 10 15

Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 173

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 173

Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile

1 5 10 15

Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 174

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 174

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 175

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 175

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 176

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 176

Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser

1 5 10 15

Gly Leu Gly Cys

20

<210> 177

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 177

Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly

1 5 10 15

Leu Gly Cys

<210> 178

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 178

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

1 5 10 15

Gly Cys

<210> 179

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 179

Gly Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 180

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 180

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly
20 25 30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Asn
35 40 45

Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 181

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 181

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

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 182

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 182

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> 183

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetic Polypeptide

<400> 183

Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 184

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 184

Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Asn Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

<210> 185

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 185

Pro Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 186

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 186

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

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 187

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 187

Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys

1 5 10 15

Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu

20 25 30

Gly Cys

<210> 188

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 188

Pro Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys

1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 189

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 189

Pro Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys

1 5 10 15

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 190

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 190

Met Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu
1 5 10 15

Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys
20 25 30

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
35 40 45

Met Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 191

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 191

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> 192

<211
> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 192

Met Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 193

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 193

Met Gly His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Gly Ala Asn Lys

1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

20 25 30

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 194

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 194

Met Gly Ala Asn Arg Arg Gly Leu Ser Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys

1 5 10 15

Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 195

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 195

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Thr Gly Asp Asp Asp Asp Lys His Met Asp
20 25 30

<210> 196

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 196

Met Val Leu Thr Lys Lys Lys Leu Gln Asp Leu Val Arg Glu Val Cys
1 5 10 15

Pro Asn Glu Gln Leu Asp Glu Asp Val Glu Glu Met Leu Leu Gln Ile
20 25 30

Ala Asp Asp Phe Ile Glu Ser Val Val Thr Ala Ala Cys Gln Leu Ala
35 40 45

Arg His Arg Lys Ser Ser Thr Leu Glu Val Lys Asp Val Gln Leu His
50 55 60

Leu Glu Arg Gln Trp Asn Met Trp Ile Met Gly Ser Ser His His His
65 70 75 80

His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Thr Gly Asp
85 90 95

Asp Asp Asp Lys His Met Asp Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
100 105 110

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
115 120 125

Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
130 135 140

<210> 197

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 197

Val Leu Thr Lys Lys Lys Leu Gln Asp Leu Val Arg Glu Val Cys Pro
1 5 10 15

Asn Glu Gln Leu Asp Glu Asp Val Glu Glu Met Leu Leu Gln Ile Ala
20 25 30

Asp Asp Phe Ile Glu Ser Val Val Thr Ala Ala Cys Gln Leu Ala Arg
35 40 45

His Arg Lys Ser Ser Thr Leu Glu Val Lys Asp Val Gln Leu His Leu
50 55 60

Glu Arg Gln Trp Asn Met Trp Ile
65 70

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 198

Pro Gly Gln Glu His Pro Asn Ala Arg
1 5

<210> 199

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 199

Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly
1 5 10 15

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

<210> 200

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Polypeptide

<400> 200

Gly Ala Asn Lys Pro

1 5

<210> 201

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 201

Gly Ala Asn Pro Lys

1 5

<210> 202

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 202

Gly Ala Asn Pro Gln

1 5

<210> 203

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<

400> 203

Gly Ala Asn Gln Lys

1 5

<210> 204

<211> 41

<212> PRT

<213> Triakis scyllium

<400> 204

Arg Leu Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg
1 5 10 15

Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg
20 25 30

Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 205

<211> 39

<212> PRT

<213> Triakis scyllium

<400> 205

Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg Ser Lys
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 206

<211> 38

<212> PRT

<213> Triakis scyllium

<400> 206

Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Arg Gly Arg Ser Lys Lys
1 5 10 15

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 207

<211> 22

<212> PRT

<213> Triakis scyllium

<400> 207

Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 208

<211> 41

<212> PRT

<213> Lamna ditropis

<400

> 208

Arg Leu Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg
1 5 10 15

Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg
20 25 30

Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35 40

<210> 209

<211> 39

<212> PRT

<213> Lamna ditropis

<400> 209

Leu Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg Ser Lys
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 210

<211> 38

<212> PRT

<213> Lamna ditropis

<400> 210

Lys Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg Ser Lys Lys
1 5 10 15
Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
20 25 30

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 211
<211> 29
<212> PRT
<213> Lamna ditropis
<400> 211
Phe Lys Gly Arg Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val
1 5 10 15
Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys
20 25

<210> 212
<211> 22
<212> PRT
<213> Lamna ditropis
<400> 212
Gly Pro Ser Arg Gly Cys Phe Gly Val Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 213
<211> 41
<212> PRT
<213> Squalus acanthias
<400> 213
Arg Leu Leu Gln Asp Leu Ser Asn Asn Pro Leu Arg Phe Lys Gly Arg
1 5 10 15
Ser Lys Lys Gly Pro Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg
20 25 30

Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu Gly Cys

35 40

<210> 214

<211> 22

<212> PRT

<

213> Squalus acanthias

<400> 214

Gly Pro Ser Arg Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 215

<211> 22

<212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 215

Gly Trp Asn Arg Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 216

<211> 24

<

212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 216

Pro Met Val Ala Gly Gly Gly Cys Phe Gly Met Lys Met Asp Arg Ile

1 5 10 15

Gly Ser Ile Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 217

<211> 27

<212> PRT

<213> Arothron maculatus

<400> 217

Gly Arg Ser Ser Met Val Gly Gly Arg Gly Cys Phe Gly Met Lys Ile

1 5 10 15

Asp Arg Ile Gly Ser Ile Ser Gly Leu Gly Cys

20 25

<210> 218

<211> 22

<212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 218

Gly Gly Met Arg Ser Cys Phe Gly Val Arg Leu Glu Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Phe Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 219

<211> 22

<212> PRT

<213> Arothron maculatus

<400> 219

Gly Gly Leu Arg Ser Cys Phe Gly Val Arg Leu Ala Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Phe Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 220

<211> 25

<212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 220

Gly Gly Ser Thr Ser Arg Ser Gly Cys Phe Gly His Lys Met Asp Arg

1 5 10 15

Ile Gly Thr Ile Ser Gly Met Gly Cys

20 25

<210> 221

<211> 24

<212> PRT

<213> Arothron maculatus

<400> 221

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Gly Cys Phe Gly His Lys Met Asp Arg Ile

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ser Gly Met Gly Cys

20

<210> 222

<211> 39

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 222

Leu Leu His Asp His Pro Asn Pro Arg Lys Tyr Lys Pro Ala Asn Lys

1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

20 25 30

Ser Thr Ser Gly Leu Gly Cys

35

<210> 223

<211> 22

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 223

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Thr Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 224

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 224

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 225

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 225

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Gln Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 226

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 226

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 227

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 227

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 228

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 228

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20 25

<210> 229

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 229

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

<210> 230

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sythetnic Polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 230

Ile Glu Gly Arg Xaa

1 5

<210> 231

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 231

Asp Asp Asp Asp Lys Xaa

1 5

<210> 232

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 232

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Gly

1 5

<210> 233

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 233

Val Asp Asp Arg

1

<210> 234

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 234

Gly Ser Asp Arg

1

<210> 235

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 235

Ile Thr Asp Arg

1

<210> 236

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 236

Pro Gly Asp Arg

1

<210> 237

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 237

Ala Phe Leu Gly Pro Gly Asp Arg

1 5