

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3328416 DAL
TITOLO:

"USO DI VARIANTI DEL PEPTIDE NATRIURETICO DI TIPO C PER IL
TRATTAMENTO DELLA DISPLASIA SCHELETRICA"

Depositata il:

*** **

DESCRIZIONE

Campo della divulgazione

La presente divulgazione fa riferimento, in generale, all'uso di varianti del peptide natriuretico di tipo C (CNP) per il trattamento delle displasie scheletriche e a formulazioni di peptidi di varianti di CNP.

Campo tecnico della divulgazione

La famiglia dei peptidi natriuretici è costituita da tre peptidi strutturalmente correlati: il peptide natriuretico atriale (ANP) (n. di accesso Genbank NP_006163, per la proteina precursore di ANP, NPPA), il peptide natriuretico cerebrale (BNP) (n. di accesso Genbank NP_002512, per la proteina precursore di BNP, NPPB) e il peptide natriuretico di tipo C (CNP) (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990) (n. di accesso GenBank NP_077720, per la proteina precursore di CNP, NPPC) (J. Hypertens., 10: 907-912 (1992)). Questi piccoli peptidi a catena singola (ANP, BNP, CNP) hanno una struttura ad ansa di 17 amminoacidi (Levin et al., N. Engl. J. Med., 339: 863-870 (1998)) e svolgono ruoli importanti in più processi

biologici. ANP e BNP si legano al recettore del peptide natriuretico A (NPR-A), denominato anche guanilil ciclasi A (GC-A), e lo attivano, con conseguente aumento dei livelli intracellulari di guanosina monofosfato ciclico (cGMP). Analogamente, il CNP interagisce con l'NPR-B (GC-B) per stimolare la generazione di cGMP (J. Hypertens., 10: 1111-1114 (1992)). Un terzo tipo di recettore, NPR-C, lega ciascuno dei peptidi natriuretici con alta affinità e funziona principalmente per catturare i peptidi dal compartimento extracellulare e depositare i peptidi nei lisosomi, dove vengono degradati (Science, 238: 675-678 (1987)). ANP e BNP sono prodotti principalmente all'interno delle cellule muscolari del cuore e si ritiene che svolgano ruoli importanti nell'omeostasi cardiovascolare (Science, 252: 120-123 (1991)). Il CNP è espresso più ampiamente, incluso nel sistema nervoso centrale, nel tratto riproduttivo, nelle ossa e nell'endotelio dei vasi sanguigni (Hypertension, 49: 419-426 (2007)).

Nell'essere umano, il CNP è inizialmente prodotto dal gene precursore del peptide natriuretico C (NPPC) come un polipeptide pre-pro di 126 amminoacidi a catena singola (Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 863-870 (1990)). La rimozione del peptide segnale produce pro-CNP e l'ulteriore clivaggio da parte dell'endoproteasi furina genera un peptide attivo di 53 amminoacidi (CNP-53), che viene secreto e clivato nuovamente per produrre il peptide maturo di 22 amminoacidi

(CNP-22) (Wu, J. Biol. Chem. 278: 25847-852 (2003)). CNP-53 e CNP-22 differiscono nella loro distribuzione, con CNP-53 predominante nei tessuti, mentre CNP-22 si trova principalmente nel plasma e nel liquido cerebrospinale (J. Alfonzo, Recept. Signal. Transduct. Res., 26: 269-297 (2006)). La forma di CNP predominante nella cartilagine è ignota. Sia CNP-53 sia CNP-22 si legano in modo simile a NPR-B. Per di più, entrambi inducono la produzione di cGMP in modo simile e dipendente dalla dose (VT Yeung, Peptides, 17: 101-106 (1996)).

I geni e i polipeptidi naturali di CNP sono stati descritti in precedenza. Il brevetto statunitense n. 5,352,770 divulga CNP-22 isolato e purificato da cervello suino identico in sequenza al CNP umano e il suo uso nel trattamento delle indicazioni cardiovascolari. Il brevetto statunitense n. 6,034,231 divulga il gene e il polipeptide umano di proCNP (126 amminoacidi) e il gene e il polipeptide umani di CNP-53.

La clearance del CNP dallo spazio extracellulare avviene attraverso l'azione dell'endopeptidasi neutra (NEP) legata alla membrana, che degrada rapidamente il CNP (Biochem. J., 291 (Pt 1): 83-88 (1993)), e attraverso NPR-C, che si lega al CNP e lo deposita nei lisosomi, dove il CNP viene degradato. È stato dimostrato che il CNP ha un'emivita *in vivo* di 2,6 minuti nell'essere umano normale (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). La bassa concentrazione plasmatica di CNP (J. Bone Miner. Res., 19 (Suppl.1)S20 (2004)) e la sua co-

espressione con NPR-B in un numerosi tessuti suggeriscono che il CNP funziona principalmente attraverso un meccanismo autocrino/paracrino.

Come affermato in precedenza, il CNP si lega al recettore del peptide natriuretico B (NPR-B), denominato anche guanilil ciclasi B (GC-B), e lo attiva, con conseguente aumento dei livelli intracellulari di guanosina monofosfato ciclico (cGMP). La segnalazione a valle mediata dalla generazione di cGMP influenza una vasta gamma di processi biologici che includono l'ossificazione endocondrale. Di conseguenza, livelli elevati o ridotti di uno qualsiasi dei componenti di questa via possono portare a una crescita aberrante dell'osso o della cartilagine. Per esempio, il knockout di CNP o NPR-B in modelli murini dà come risultato animali con un fenotipo nanizzato con ossa lunghe e vertebre più corte. Mutazioni in NPR-B umano che bloccano la corretta segnalazione di CNP sono state identificate e hanno come risultato il nanismo (Olney, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 91(4): 1229-1232 (2006); Bartels, et al., Am. J. Hum. Genet. 75: 27-34 (2004)). Al contrario, i topi ingegnerizzati per produrre livelli elevati di CNP mostrano ossa lunghe e vertebre allungate.

L'acondroplasia è il risultato di una mutazione autosomica dominante nel gene del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti 3 (FGFR-3), che causa un'anomalia nella formazione della cartilagine. FGFR-3 normalmente ha un

effetto regolatorio negativo sulla crescita dei condrociti, e quindi sulla crescita ossea. Nell'acondroplasia, la forma mutata di FGFR-3 è costitutivamente attiva, il che determina un grave accorciamento delle ossa. Sia la proliferazione che la differenziazione dei condrociti sembrano essere disturbate, determinando una cartilagine delle piastre di crescita notevolmente corta (P. Kreci et al., J. Cell Sci. 118: 5089-5100 (2005)). L'ossificazione endocondrale è il processo che regola la crescita longitudinale delle ossa lunghe. Vi sono quattro zone della piastra di crescita - a riposo, proliferativa, ipertrofica e la zona di calcificazione. Nella piastra di crescita, NPR-B è espresso da cellule proliferative mentre NPR-C è espresso da cellule ipertrofiche (Yamashite et al., J. Biochem. 127: 177-179 (2000)). Nella normale crescita dell'osso endocondrale, i condrociti si organizzano in colonne e proliferano nella zona proliferativa della piastra di crescita. Queste colonne sono disorganizzate nei pazienti affetti da acondroplasia. In aggiunta, la zona ipertrofica è quella in cui le cellule diventano grandi e vengono eventualmente sottoposte ad apoptosi (lisi), determinando l'invasione dell'osteocita e la mineralizzazione. I condrociti ipertrofici e le dimensioni complessive della zona sono molto più piccoli nei pazienti con acondroplasia rispetto ai pazienti normali. Il CNP è un agonista di NPR-B, un regolatore positivo della crescita dei condrociti e delle ossa. La segnalazione a

valle di CNP/NPR-B inibisce la via di FGFR-3 a livello della proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAP K). L'inibizione in corrispondenza di MAP K promuove la proliferazione e la differenziazione dei condrociti nelle zone proliferative e ipertrofiche della piastra di crescita, con conseguente crescita ossea.

Nell'essere umano le mutazioni attivanti di FGFR-3 sono la causa principale del nanismo genetico. I topi che hanno attivato FGFR-3 servono come modello di acondroplasia, la forma più comune delle displasie scheletriche, e la sovraespressione del CNP salva questi animali dal nanismo. Di conseguenza, il CNP e le varianti funzionali del CNP sono potenziali agenti terapeutici per il trattamento delle varie displasie scheletriche.

L'uso terapeutico del CNP è attualmente limitato dalla sua breve emivita plasmatica, che è stata dimostrata essere di 2,6 minuti *in vivo* nell'essere umano (J Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). Per aumentare la concentrazione di CNP al di sopra dei livelli intrinseci (circa 5 pM) tipicamente presenti nel plasma umano, l'infusione continua è stata necessaria in tutti gli studi condotti su esseri umani e animali con CNP somministrato per via sistemica. Due meccanismi attraverso i quali l'emivita del CNP è ridotta nel plasma umano sono la degradazione da parte dell'endopeptidasi neutra (NEP) e la clearance da parte del recettore del peptide natriuretico C

(NPR-C) (Growth Horm. & IGF Res., 16: S6-S14 (2006)). Una variante di CNP con un'emivita sierica *in vivo* più lunga e con attività simile o migliorata rispetto a quella del CNP wild-type è importante per una strategia terapeutica sostenibile.

Sono state valutate le attività biologiche di vari analoghi e derivati del CNP. Si veda per esempio il brevetto statunitense 7,276,481, la pubblicazione PCT n. WO 94/20534, che divulga una chimera di CNP-22 e il C-terminale di 5 amminoacidi di ANP indicato come il peptide vasonatrina (VNP). Il brevetto statunitense 8,198,242 e 8,598,121 divulgano l'uso di varianti di CNP per il trattamento delle displasie scheletriche, come l'acondroplasia. Il brevetto statunitense 7,642,243 e 8,658,373 descrivono l'uso di varianti di CNP-22 o CNP-53 per il trattamento dell'artrite. US 2010/297021 divulga composizioni farmaceutiche comprendenti peptidi di variante di CNP e il loro uso nel trattamento di patologie ossee.

Riassunto della divulgazione

La presente invenzione fornisce una formulazione secondo la rivendicazione 1 e composizioni comprendenti peptidi di variante di CNP per l'uso nel trattamento delle displasie scheletriche, e per l'uso nell'aumento della crescita e della velocità di crescita delle ossa lunghe. È divulgato nella presente che la somministrazione di peptidi di varianti di CNP può portare a un miglioramento della velocità di crescita nei soggetti con acondroplasia. In varie forme di realizzazione, il

peptide di variante di CNP è Pro-Gly-CNP-37.

È anche divulgato un metodo per il trattamento della displasia scheletrica, comprendente la somministrazione di una composizione comprendente un peptide di variante di CNP a un soggetto che ne ha bisogno in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui la somministrazione tratta una displasia scheletrica o migliora almeno un sintomo o una conseguenza fisiologica della displasia scheletrica.

Il trattamento può essere un miglioramento di uno o più sintomi di displasia scheletrica selezionati dal gruppo costituito da aumento della crescita assoluta, miglioramento o aumento della velocità di crescita, aumento della densità minerale ossea (BMD) mediante QCT, miglioramento della morfologia della piastra di crescita, aumento della crescita delle ossa lunghe, miglioramento della morfologia della colonna vertebrale, miglioramento o aumento del range di movimento dell'articolazione del gomito e diminuzione dell'apnea del sonno.

In una forma di realizzazione, la displasia scheletrica è selezionata dal gruppo costituito da acondroplasia, ipocondroplasia, bassa statura, nanismo, osteocondrodisplasie, displasia tanatofora, osteogenesi imperfetta, acondrogenesi, condrodisplasia punctata, acondroplasia omozigote, condrodisplasia punctata, displasia camptomelica, ipofosfatasia letale congenita, osteogenesi imperfetta tipo letale

perinatale, sindromi costa corta-polidattilia, ipocondroplasia, condrodisplasia punctata tipo rizomelico, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia spondiloepifisaria congenita, atelosteogenesi, displasia diastrofica, femore corto congenito, displasia mesomelica tipo Langer, displasia mesomelica tipo Nievergelt, sindrome di Robinow, sindrome di Reinhardt, acrodisostosi, disostosi periferica, displasia di Kniest, fibrocondrogenesi, sindrome di Roberts, displasia acromesomelica, micromelia, sindrome di Morquio, sindrome di Kniest, displasia metatrofica e displasia spondiloepimetafisaria e. In una forma di realizzazione preferita, la displasia scheletrica è l'acondroplasia.

È anche divulgato un metodo per aumentare la crescita delle ossa lunghe in un soggetto, comprendente la somministrazione di una composizione comprendente un peptide di variante di CNP a un soggetto che ne ha bisogno in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui la somministrazione aumenta la crescita delle ossa lunghe. In una forma di realizzazione preferita, il soggetto ha un'acondroplasia.

È anche divulgato un metodo per ottimizzare o aumentare la velocità di crescita (vale a dire la velocità di crescita) in un soggetto, comprendente la somministrazione di una composizione comprendente un peptide di variante di CNP a un soggetto che ne ha bisogno in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui la somministrazione ottimizza o aumenta la velocità di

crescita nel soggetto. Il soggetto ha preferibilmente un'acondroplasia. L'ottimizzazione o l'aumento della velocità di crescita può essere un aumento della velocità di crescita annualizzata nell'intervallo di una variazione del 25%-50% rispetto al valore basale nel soggetto. L'ottimizzazione o l'aumento della velocità di crescita può essere un aumento della velocità di crescita annualizzata di una variazione di almeno circa il 25%, più preferibilmente di almeno circa il 40%, rispetto al valore basale nel soggetto.

È contemplato che l'ottimizzazione della velocità di crescita possa essere valutato misurando l'altezza in piedi, l'altezza da seduto, il peso, la circonferenza della testa, la lunghezza della parte superiore del braccio, la lunghezza della parte inferiore del braccio, la lunghezza della parte superiore della gamba, la lunghezza della parte inferiore della gamba, la lunghezza delle mani e/o la lunghezza dei piedi.

Nei vari metodi e composizioni descritti nella presente, il peptide di variante di CNP può essere selezionato dal gruppo costituito da:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N); ID SEQ
N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37; ID SEQ
N:2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; ID SEQ
N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37 (M32N); ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37; ID SEQ N:5);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37; ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP-37 o CNP-38: ID SEQ N:7).

In varie forme di realizzazione preferite, il peptide di variante di CNP è Pro-Gly-CNP-37.

Nei vari metodi descritti nella presente, la quantità di peptide di variante di CNP somministrata varia da circa 7,5 µg/kg a circa 100 µg/kg, preferibilmente da circa 7,5 µg/kg a circa 80 µg/kg, più preferibilmente da circa 7,5 µg/kg a circa 60 µg/kg. In varie forme di realizzazione, la quantità di peptide di variante di CNP somministrata è di almeno 7,5 µg/kg, almeno 15 µg/kg, almeno 30 µg/kg o almeno 60 µg/kg.

Nei vari metodi descritti nella presente, il peptide di variante di CNP o la composizione o la formulazione comprendente lo stesso è somministrato/a per via sottocutanea o parenterale, preferibilmente per via sottocutanea. È anche contemplato che il peptide di variante di CNP venga somministrato per altre vie. Vie di somministrazione esemplificative includono, senza alcuna limitazione, somministrazione sottocutanea, intra-articolare, intravenosa,

intra-arteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, intradermica, intratecale, intraperitoneale, intramuscolare, intradermica, intratecale, topica, transdermica o transmucosale.

Nei vari metodi descritti nella presente, il peptide di variante di CNP o la composizione o formulazione comprendente lo stesso è somministrato/a al soggetto in un unico trattamento o in più dosi. Le più dosi possono essere somministrate una volta al giorno o in più dosi nel corso del trattamento. Il peptide di variante di CNP o la composizione o formulazione comprendente lo stesso può essere somministrato/a, in dose singola o in più dosi, giornalmente, a giorni alterni, ogni 3 giorni, 2 volte alla settimana, 3 volte alla settimana, settimanalmente, ogni due settimane, ogni 3 settimane, mensilmente, ogni 6 settimane, ogni 2 mesi, ogni 3 mesi o altro come ritenuto opportuno da un medico curante. In forme di realizzazione particolarmente preferite, il peptide di variante di CNP o la composizione o formulazione comprendente lo stesso è somministrato/a al soggetto una volta al giorno per un periodo di almeno un mese, due mesi, tre mesi, quattro mesi, cinque mesi, sei mesi, sette mesi, otto mesi, nove mesi, dieci mesi, undici mesi, dodici mesi o più.

La somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso può essere regolata per consentire periodi di trattamento

preventivo o terapeutico seguiti da un periodo di recupero. Per esempio, il peptide di variante di CNP o la composizione o formulazione comprendente lo stesso può essere somministrato/a per via intra-articolare, sottocutanea, intravenosa o con un'altra modalità quotidianamente o più volte alla settimana per un periodo di tempo, seguito da un periodo di assenza di trattamento, quindi il ciclo viene ripetuto. Il periodo iniziale di trattamento (per esempio la somministrazione del peptide di variante di CNP giornalmente o più volte alla settimana) può essere di 3 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, 4 settimane, 5 settimane, 6 settimane, 7 settimane, 8 settimane, 9 settimane, 10 settimane, 11 settimane o 12 settimane. In un esempio correlato, il periodo di assenza di trattamento dura 3 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane o 4 settimane. In alcuni esempi, il regime di dosaggio del peptide di variante di CNP è giornaliero per 3 giorni seguito da 3 giorni di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 1 settimana seguito da 3 giorni o 1 settimana di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 2 settimane seguito da 1 o 2 settimane di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 3 settimane seguito da 1, 2 o 3 settimane di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 settimane seguito da 1, 2, 3 o 4 settimane di riposo.

Nei vari metodi descritti nella presente, è preferibile

che la somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso non causi o abbia come risultato un evento avverso nel soggetto classificato come grado due o superiore. In altri casi, la somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso non comporta una variazione clinicamente significativa della concentrazione di emoglobina nel sangue, del numero di piastrine nel sangue, della concentrazione di elettroliti nel sangue, della concentrazione di azoto ureico nel sangue, della concentrazione di creatinina nel sangue, della concentrazione di fosfatasi alcalina nel sangue, della concentrazione di alanina aminotransferasi nel sangue e/o della concentrazione di aspartato aminotransferasi nel sangue in detto soggetto.

Nei vari metodi descritti nella presente, la somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso comporta una variazione (i) del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo, (ii) del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio, o (iii) del rapporto tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba, di un valore compreso tra circa -0,25 e circa 0,25, circa -0,20 e circa 0,20, circa -0,15 e circa 0,15, circa -0,10 e circa 0,10 o

circa -0,05 e circa 0,05, rispetto al valore basale (vale a dire prima della somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso).

La presente invenzione fornisce composizioni o formulazioni comprendenti un peptide di variante di CNP. La composizione o formulazione può ulteriormente comprendere un eccipiente, vettori o diluente farmaceuticamente accettabile. La composizione può essere preparata a partire da una formulazione, liquida o liofilizzata, comprendente un tampone di acido citrico/citrato o un tampone di acido acetico/acetato avente un pH da circa 4 a circa 6. In varie forme di realizzazione, il pH è 5,5.

È anche divulgato, ma non facente parte dell'invenzione, un metodo di trattamento come descritto nella presente comprendente inoltre la somministrazione di un secondo agente.

I peptidi di variante di CNP usati nei metodi e nelle composizioni o formulazioni descritte nella presente possono essere attaccati a un acido idrofobico e possono essere attaccati a uno o più acidi idrofobici. Esempi non limitativi di acidi idrofobici includono gli acidi carbossilici C₅-C₁₂ a catena lineare o ramificata, satura o insatura (per esempio acido pentanoico, acido eptanoico, eccetera) e acidi grassi naturali. Gli acidi idrofobici possono essere attaccati all'N-terminale, al C-terminale e/o alla catena laterale di uno o più

residui amminoacidici. In una forma di realizzazione, gli acidi idrofobici sono coniugati all'N-terminale.

I peptidi di varianti di CNP usati nei metodi e nelle composizioni divulgati nella presente sono chimere, o proteine di fusione, comprendenti un peptide di variante di CNP e un peptide o una proteina clivabile, o un tag peptidico. Proteine o peptidi clivabili esemplificativi includono, senza alcuna limitazione, tag di istidina (per esempio esa-His); TAF12: fattore di trascrizione umano TAF12; KSI: chetosteroidi isomerasi; MBP: proteina legante il maltosio; β -Gal: β -galattosidasi; GST: glutatione-S-transferasi; Trx: tioredoxina; CBD: dominio legante la chitina; BMPM: mutazione BMP-2, SUMO, CAT, TrpE, proteina stafilococcica A, proteine streptococciche, proteina legante l'amido, dominio dell'endoglucanasi A legante la cellulosa, dominio dell'esoglucanasi Cex legante la cellulosa, dominio legante la biotina, recA, Flag, c-Myc, poli(His), poli(Arg), poli(Asp), poli(Gln), poli(Phe), poli(Cys), proteina fluorescente verde, proteina fluorescente rossa, proteina fluorescente gialla, proteina fluorescente ciano, biotina, avidina, streptavidina, epitopi anticorpali e relativi frammenti.

Il peptide di variante di CNP può essere un monomero o un dimerico. In una forma di realizzazione correlata i monomeri dei peptidi di variante di CNP dimerici possono essere attaccati N-terminale a N-terminale tramite un linker o nessun linker, N-

terminale a C-terminale tramite un linker o nessun linker oppure C-terminale a C-terminale tramite un linker o nessun linker.

I peptidi di variante di CNP possono avere un'attività biologica sostanzialmente uguale o migliore rispetto al CNP-22 wild-type. Per esempio, i peptidi di variante di CNP possono trattenere almeno il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95% o più dell'attività del CNP-22 wild-type, oppure possono avere un'attività maggiore rispetto al CNP-22, per esempio per quanto riguarda l'interazione con NPR-B (GC-B) per stimolare la generazione di cGMP. In alternativa o in aggiunta, i peptidi di variante di CNP possono trattenere almeno il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95% o più dell'attività del CNP-22 wild-type oppure possono avere un'attività maggiore rispetto al CNP-22, per quanto riguarda la regolazione della crescita dell'osso endocondrale e dell'attività dei condrociti, che include, senza alcuna limitazione, la proliferazione dei condrociti, la differenziazione dei condrociti, l'inibizione della via di segnalazione della proteina attivata dal mitogeno (MAP) chinasi/MEK (Raf-1) chinasi e la promozione dell'ossificazione endocondrale. I peptidi di variante di CNP possono comprendere una sequenza amminoacidica almeno del 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o più identica o omologa agli amminoacidi 6-22 o 1-22 del CNP-22 wild-type.

I peptidi di variante di CNP possono facoltativamente

avere una o più coniugazioni o estensioni, per esempio in corrispondenza dell'N- e/o C-terminale per facilitare il targeting della cartilagine, ridurre la clearance renale e/o aumentare la resistenza alla degradazione della NEP. Tali coniugazioni o estensioni possono comprendere molecole o sequenze formate o derivate, per esempio, da poliAsp, poliGlu, peptidi di targeting della cartilagine, sialoproteina, PEG, carboidrati, acidi idrofobici, NPPC o (poli)peptidi non-CNP o relative combinazioni.

È ulteriormente contemplato che i peptidi di variante di CNP possono essere coniugati a una frazione polimerica o non polimerica idrofobica, come per esempio all'acido eptanoico, all'acido pentanoico o ad acidi grassi. La frazione idrofobica può essere coniugata alla catena laterale di un residuo amminoacidico, che include, senza alcuna limitazione, una lisina, una serina, una cisteina o una treonina, oppure può essere attaccata all'N-terminale e/o al C-terminale della variante di CNP.

I peptidi di variante di CNP utili nei metodi possono avere un pI nell'intervallo da circa 8 a circa 10,5 o da circa 8,5 a circa 10.

È anche divulgato l'uso di una composizione farmaceutica comprendente un peptide di variante di CNP, facoltativamente un altro agente biologicamente attivo e facoltativamente un eccipiente, vettore o diluente farmaceuticamente accettabile.

Le composizioni possono essere composizioni farmaceutiche sterili adatte per l'iniezione parenterale. Le composizioni possono comprendere un peptide di variante di CNP sostanzialmente puro, per esempio avente una purezza di almeno circa il 90% o il 95%. Le composizioni possono contenere meno di circa il 5%, il 4%, il 3%, il 2%, l'1% o lo 0,5% di contaminanti, come per esempio altre proteine umane, proteine suine o CNP-53 o relativi frammenti (diversi dal peptide di variante di CNP desiderato). La composizione sterile può essere somministrata a un soggetto per il trattamento o la prevenzione di una displasia scheletrica o di uno o più sintomi o conseguenze fisiologiche di una displasia scheletrica divulgata nella presente.

I peptidi di variante di CNP utili nella presente mantengono vantaggiosamente l'attività del CNP e mostrano un aumento dell'emivita sierica. La ritenzione dell'attività del CNP può essere dimostrata, per esempio, come ritenzione dell'effetto biologico desiderato *in vivo*, oppure come ritenzione di almeno circa il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95% o di almeno circa il 100% dell'attività stimolante di cGMP del CNP-22, alla stessa concentrazione (per esempio 1 μ M di peptide CNP o maggiore dell'ED80). I peptidi di variante di CNP possono mostrare un aumento dell'emivita sierica di almeno circa 1,5 volte, 2 volte, 3 volte, 4 volte, 5 volte, 10 volte, 15 volte, 20 volte, 25 volte, 30 volte, 35 volte o 40

volte rispetto al CNP-22.

I peptidi di variante di CNP descritti nella presente possono avere una aumentata resistenza alla NEP e presentare un'emivita aumentata rispetto al CNP-22 wild-type. L'emivita dei peptidi di variante di CNP è preferibilmente aumentata di circa il 20%, il 30%, il 40%, il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o di circa il 100% rispetto al CNP-22 wild-type.

È anche divulgato l'uso di uno qualsiasi dei precedenti peptidi di variante di CNP, o della composizione o formulazione comprendente gli stessi, descritti nella presente in preparazione di un medicinale per il trattamento della displasia scheletrica e dei sintomi o di altre manifestazioni fisiologiche descritte nella presente associate alla displasia scheletrica. Sono anche contemplate siringhe, per esempio siringhe monouso o pre-riempite, contenitori sigillati sterili, per esempio fiale, flaconi, recipienti e/o kit o confezioni comprendenti uno qualsiasi dei precedenti peptidi di variante di CNP, o composizioni o formulazioni comprendenti gli stessi, facoltativamente con opportune istruzioni per l'uso.

Nella presente sono anche divulgate formulazioni comprendenti (a) un peptide di variante di CNP descritto nella presente e (b) uno o più componenti selezionati dal gruppo costituito da un agente tampone, un agente di isotonicità, uno stabilizzatore e un agente anti-adsorbente. Gli agenti tampone

impiegati nella formulazione sono acido citrico monoidrato e sodio citrato diidrato. Gli agenti di isotonicità impiegati nelle formulazioni della presente invenzione sono il trealosio diidrato e il D-mannitolo. Lo stabilizzatore impiegato nelle formulazioni della presente invenzione è la L-metionina. L'agente anti-adsorbente impiegato nelle formulazioni della presente invenzione è il polisorbato 80.

Le formulazioni della presente invenzione possono essere liofilizzate, in forma liquida o in forma solida che è stata ricostituita a partire da una forma precedentemente liofilizzata. Le formulazioni della presente invenzione possono essere prive di conservanti e, facoltativamente, possono essere contenute all'interno di una fiala di vetro borosilicato tipo 1 non trattata. Facoltativamente, le formulazioni della presente invenzione hanno un pH nell'intervallo tra 5,0 e 6,0, preferibilmente 5,5.

In altre forme di realizzazione, le formulazioni della presente invenzione comprendono un peptide di variante di CNP a una concentrazione di almeno 2,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10,0 mg/ml o superiore. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la formulazione della presente invenzione comprende un peptide di variante di CNP a una concentrazione di 10,0 mg/ml. In forme di realizzazione particolarmente preferite, il peptide di variante di CNP della formulazione è Pro-Gly-CNP-37.

Le formulazioni della presente invenzione comprendono un

peptide di variante di CNP come descritto nella presente, acido citrico monoidrato, sodio citrato diidrato, trealosio diidrato, D-mannitolo, L-metionina e polisorbato 80. In alcune forme di realizzazione preferite, il peptide di variante di CNP è presente a una concentrazione compresa tra 2,0 mg/ml e 10,0 mg/ml, l'acido citrico monoidrato è presente a una concentrazione compresa tra 0,15 mg/ml e 0,40 mg/ml, il sodio citrato diidrato è presente a una concentrazione compresa tra 0,5 mg/ml e 1,5 mg/ml, il trealosio diidrato è presente a una concentrazione compresa tra 30 mg/ml e 70 mg/ml, il D-mannitolo è presente a una concentrazione compresa tra 10 mg/ml e 20,0 mg/ml, la L-metionina è presente a una concentrazione compresa tra 0,5 mg/ml e 1,5 mg/ml e il polisorbato 80 è presente a una concentrazione compresa tra 0,01 mg/ml e 0,1 mg/ml. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la variante di CNP è presente a una concentrazione di 10,0 mg/ml, l'acido citrico monoidrato è presente a una concentrazione di 0,28 mg/ml, il sodio citrato diidrato è presente a una concentrazione di 1,08 mg/ml, il trealosio diidrato è presente a una concentrazione di 58,01 mg/ml, il D-mannitolo è presente a una concentrazione di 15,0 mg/ml, la L-metionina è presente a una concentrazione di 0,73 mg/ml e il polisorbato 80 è presente a una concentrazione di 0,05 mg/ml.

Le formulazioni contenenti peptidi di variante di CNP descritte nella presente sono utili e possono essere impiegate

nei vari metodi descritti nella presente. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione della presente invenzione sono descritti nelle rivendicazioni allegate.

È assodato che ciascuna caratteristica o forma di realizzazione, o combinazione, descritta nella presente è un esempio illustrativo non limitativo di uno qualsiasi degli aspetti della divulgazione e, in quanto tale, è da intendersi come combinabile con qualsiasi altra caratteristica o forma di realizzazione, o combinazione, descritta nella presente. Per esempio, laddove le caratteristiche sono descritte con un linguaggio come "una forma di realizzazione", "alcune forme di realizzazione", "ulteriore forma di realizzazione", "forme di realizzazione esemplificative specifiche" e/o "altra forma di realizzazione", ciascuno di questi tipi di forme di realizzazione è un esempio non limitativo di una caratteristica che si intende combinare con qualsiasi altra caratteristica, o combinazione di caratteristiche, descritta nella presente senza dover elencare ogni possibile combinazione. Tali caratteristiche o combinazioni di caratteristiche si applicano a uno qualsiasi degli aspetti della divulgazione. Laddove sono divulgati esempi di valori che rientrano negli intervalli, ciascuno di questi esempi è contemplato come possibile punto finale di un intervallo, sono contemplati tutti i valori numerici tra tali punti finali e sono previste tutte le combinazioni di punti finali superiori e inferiori.

Descrizione dettagliata della divulgazione

La presente divulgazione fa riferimento a peptidi di variante di CNP per l'uso nel trattamento delle displasie scheletriche, di uno o più sintomi o conseguenze fisiologiche delle displasie scheletriche e di altri disturbi che presentano una displasia scheletrica e/o sintomi o componenti associati al CNP. La presente divulgazione fa anche riferimento a composizioni e formulazioni comprendenti un peptide di variante di CNP e all'uso di tali composizioni o formulazioni per il trattamento della displasia scheletrica o di un sintomo o di una conseguenza fisiologica di una displasia scheletrica, l'aumento della crescita delle ossa lunghe in un soggetto che ne ha bisogno oppure il miglioramento o l'aumento della velocità di crescita in un soggetto che ne ha bisogno, per esempio in un soggetto affetto da una displasia scheletrica.

A. Definizioni

Salvo diversa affermazione, i seguenti termini usati in questa domanda, incluse la specifica e le rivendicazioni, hanno le definizioni date di seguito.

Come usati nella specifica e nelle rivendicazioni allegate, gli articoli indefiniti "un/uno/una" e gli articoli definiti "il/lo/la" includono riferimenti plurali e singolari, a meno che il contesto non imponga chiaramente altrimenti.

Il termine "circa" o "approssimativamente" significa un errore accettabile per un particolare valore, come determinato

da una persona mediamente esperta nella tecnica, che dipende in parte da come il valore viene misurato o determinato. Il termine "circa" o "approssimativamente" significa entro 1, 2, 3 o 4 deviazioni standard. Il termine "circa" o "approssimativamente" significa entro 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,05% di un dato valore o intervallo. Ogni volta che il termine "circa" o "approssimativamente" precede il primo valore numerico in una serie di due o più valori numerici, è assodato che il termine "circa" o "approssimativamente" si applica a ciascuno dei valori numerici in tale serie.

La definizione di termini di chimica standard può essere reperita in opere di riferimento, tra cui Carey e Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3° edizione, vol. A e B (Plenum Press, New York 1992). La pratica della presente divulgazione può impiegare, salvo diversa indicazione, alcuni metodi convenzionali di chimica organica sintetica, spettrometria di massa, cromatografia preparativa e analitica, chimica delle proteine, biochimica, tecnologia del DNA ricombinante e farmacologia, nell'ambito dell'esperienza nella tecnica. Si veda, per esempio, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4° edizione, 2004); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2° edizione, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N.

Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° edizione (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

In tutto il testo sono usate le seguenti abbreviazioni di

amminoacidi:

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

La notazione convenzionale è usata nella presente per rappresentare sequenze polipeptidiche e peptidiche: l'estremità sinistra di una sequenza polipeptidica o peptidica è l'ammino-terminale; l'estremità destra di una sequenza polipeptidica è il carbossi-terminale.

I peptidi di variante di CNP descritti nella presente utili nei metodi possono essere generati tramite mezzi ricombinanti, usando un polinucleotide codificante un peptide di variante di CNP. I peptidi di variante di CNP espressi da tali polinucleotidi possono essere prodotti con metodi che includono la crescita delle cellule ospiti in terreno di coltura in condizioni idonee all'espressione del polinucleotide codificante una variante di CNP, e l'isolamento del prodotto di espressione dalle cellule ospiti o dal terreno di coltura. I

prodotti di espressione effettivi possono variare leggermente dal prodotto proteico codificato a seconda di qualsiasi elaborazione post-traduzionale. Metodi per la produzione dei peptidi di variante di CNP sono divulgati almeno nel brevetto statunitense n. 8,198,242.

I termini "identico" e "identità" in percentuale, nel contesto di due o più sequenze polinucleotidiche o polipeptidiche, si riferiscono a due o più sequenze o sottosequenze che sono uguali o hanno una determinata percentuale di nucleotidi o residui amminoacidici che sono uguali, quando confrontate e allineate per la massima corrispondenza, misurata usando uno dei seguenti algoritmi di confronto di sequenze o mediante ispezione visiva.

L'espressione "sostanzialmente omologhi" o "sostanzialmente identici", nel contesto di due acidi nucleici o polipeptidi, si riferisce generalmente a due o più sequenze o sottosequenze che presentano almeno il 40%, il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90%, il 95% o il 98% di identità nucleotidica o di residuo amminoacidico, quando confrontate e allineate per la massima corrispondenza, misurata mediante uno dei seguenti algoritmi di confronto di sequenze o mediante ispezione visiva. L'omologia o identità sostanziale può esistere su regioni delle sequenze aventi almeno circa 25, 50, 100 o 150 residui in lunghezza. Le sequenze possono essere sostanzialmente omologhe o identiche su tutta la lunghezza di uno o di entrambi i

biopolimeri di confronto.

Per il confronto di sequenze, tipicamente una sequenza funge da sequenza di riferimento, con la quale vengono confrontate le sequenze di test. Quando viene usato un algoritmo di confronto di sequenze, le sequenze di test e di riferimento vengono immesse in un computer, vengono identificate le coordinate di sottosequenza, se necessario, e vengono identificati i parametri del programma dell'algoritmo di sequenza. In seguito l'algoritmo di confronto delle sequenze calcola l'identità di sequenza in percentuale per l'una o più sequenze di test rispetto alla sequenza di riferimento, in base ai parametri di programma indicati.

L'allineamento ottimale delle sequenze per il confronto può essere condotto, per esempio, mediante l'algoritmo di omologia locale di Smith e Waterman *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), mediante l'algoritmo di allineamento di omologia di Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 (1970), mediante il metodo di ricerca della somiglianza di Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 (1988), mediante implementazioni computerizzate di questi algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA nella suite software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante ispezione visiva. Un esempio di algoritmo utile è PILEUP, che utilizza una semplificazione del metodo di allineamento progressivo di Feng e Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35: 351-360

(1987) ed è simile al metodo descritto da Higgins e Sharp, CABIOS, 5: 151-153 (1989). Un altro algoritmo utile per generare allineamenti multipli di sequenze è Clustal W (Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994)). Un esempio di algoritmo adatto a determinare l'identità di sequenza in percentuale e la similarità di sequenza è l'algoritmo BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990); Henikoff e Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915 (1989); Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787 (1993)). Il software per l'esecuzione delle analisi BLAST è disponibile al pubblico attraverso il National Center for Biotechnology Information.

"Wild-type" (wt) è un'espressione che si riferisce alla forma naturale, inclusa la sequenza, di un polinucleotide, un polipeptide o una proteina in una specie. Una forma wild-type si distingue da una forma mutante di un polinucleotide, un polipeptide o una proteina derivante da una o più mutazioni genetiche.

Un primo peptide che è un "analogo" o "variante" o "derivato" di un secondo peptide può essere un peptide avente almeno circa il 50%, il 60% o il 70% di omologia di sequenza, ma inferiore al 100% di omologia di sequenza, con il secondo peptide. Tali analoghi, varianti o derivati possono essere costituiti da residui amminoacidici non presenti in natura, tra cui, senza alcuna limitazione, omoarginina, ornitina,

penicillamina e norvalina, nonché residui amminoacidici presenti in natura.

Il polipeptide precursore del peptide natriuretico C (NPPC) è un pre-pro polipeptide di 126 amminoacidi a catena singola e che, durante clivaggio, dà come risultato, in definitiva, CNP-22 wild-type (wtCNP-22). La rimozione del peptide segnale da NPPC produce pro-CNP e l'ulteriore clivaggio da parte dell'endoproteasi furina genera un peptide attivo di 53 amminoacidi (CNP-53), che viene secreto e clivato nuovamente per produrre il peptide maturo di 22 amminoacidi (CNP o CNP-22). Un "peptide di variante di CNP" può essere omologo di almeno circa il 40%, il 50%, il 60%, il 70%, il 75%, l'80%, l'85%, il 90% o il 95% rispetto all'NPPC wild-type sullo stesso numero di residui amminoacidici. È ulteriormente contemplato che un peptide di variante di CNP possa comprendere da circa 1 a circa 53, o da 1 a 38, o da 1 a 37, o da 1 a 35, o da 1 a 31, o da 1 a 27, o da 1 a 22, o da 10 a 35, o da circa 15 a circa 37 residui del polipeptide NPPC. Una variante di CNP può comprendere una sequenza di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 o 53 amminoacidi derivati dal polipeptide NPPC.

L'espressione "quantità efficace" significa un dosaggio sufficiente a produrre un risultato desiderato su una

condizione di salute, patologia o malattia di un soggetto o per uno scopo diagnostico. Il risultato desiderato può comprendere un miglioramento soggettivo o oggettivo nel ricevente del dosaggio. La "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce alla quantità di un agente efficace per produrre l'effetto benefico previsto sulla salute. Una quantità "efficace" appropriata in qualsiasi caso singolo può essere determinata da una persona mediamente esperta nella tecnica usando la sperimentazione di routine. Si comprenderà che il livello di dose specifico e la frequenza di dosaggio per ogni particolare paziente possono essere variati e dipenderanno da svariati fattori, tra cui l'attività dello specifico composto impiegato; la biodisponibilità, la stabilità metabolica, il tasso di escrezione e la lunghezza di azione di tale composto; la modalità e il tempo di somministrazione del composto; l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso e la dieta del paziente; e la gravità della particolare condizione.

Il termine "trattamento" si riferisce al trattamento profilattico o al trattamento terapeutico o al trattamento diagnostico. Per esempio, il termine "trattamento" può riferirsi alla somministrazione di un composto o di una composizione a un soggetto per scopi terapeutici, profilattici o diagnostici.

Un trattamento "profilattico" è un trattamento somministrato a un soggetto che non presenta segni di una

malattia o presenta solo segni precoci della malattia, allo scopo di diminuire il rischio di sviluppare la patologia. I composti o le composizioni della divulgazione possono essere somministrati/e come trattamento profilattico per ridurre la probabilità di sviluppare una patologia o per minimizzare la gravità della patologia, se sviluppata.

Un trattamento "terapeutico" è un trattamento somministrato a un soggetto che presenta segni o sintomi di una patologia allo scopo di diminuire o eliminare tali segni o sintomi. I segni o sintomi possono essere biochimici, cellulari, istologici, funzionali o fisici, soggettivi o oggettivi. I composti della divulgazione possono anche essere forniti come trattamento terapeutico o per la diagnosi.

"Composizione farmaceutica" o "formulazione" si riferisce a una composizione adatta all'uso farmaceutico in soggetti animali, inclusi esseri umani e mammiferi. Una composizione farmaceutica comprende una quantità terapeuticamente efficace di un peptide di variante di CNP, facoltativamente un altro agente biologicamente attivo e facoltativamente un eccipiente, vettore o diluente farmaceuticamente accettabile. Una composizione farmaceutica può includere una composizione comprendente l'uno o i più principi attivi e l'uno o i più ingredienti inerti che costituiscono il vettore, nonché qualsiasi prodotto che risulti, direttamente o indirettamente, dalla combinazione, complessazione o aggregazione di qualsiasi

due o più degli ingredienti, o dalla dissociazione di uno o più degli ingredienti, o da altri tipi di reazioni o interazioni di uno o più degli ingredienti. Di conseguenza, le composizioni farmaceutiche della presente divulgazione includono qualsiasi composizione realizzata miscelando un composto della divulgazione e un eccipiente, vettore o diluente farmaceuticamente accettabile.

L'espressione "vettore farmaceuticamente accettabile" si riferisce a uno qualsiasi dei normali vettori farmaceutici, tamponi e simili, come una soluzione salina tamponata al fosfato, una soluzione acquosa al 5% di destrosio ed emulsioni (per esempio un'emulsione di olio/acqua o acqua/olio). Esempi non limitativi di eccipienti includono adiuvanti, leganti, riempitivi, diluenti, disgreganti, agenti emulsionanti, agenti bagnanti, lubrificanti, agenti scivolanti, agenti dolcificanti, agenti aromatizzanti e coloranti. Vettori farmaceutici, eccipienti e diluenti idonei sono descritti in Remington's Pharmaceutical Sciences, 19° edizione (Mack Publishing Co., Easton, 1995). I vettori farmaceutici preferiti dipendono dalla modalità di somministrazione prevista dell'agente attivo. Tipiche modalità di somministrazione includono la somministrazione enterale (per esempio orale) o parenterale (per esempio l'iniezione sottocutanea, intramuscolare, intravenosa o intraperitoneale; oppure la somministrazione topica, transdermica o transmucosale).

Un "sale farmaceuticamente accettabile" è un sale che può essere formulato in un composto per uso farmaceutico, che include, senza alcuna limitazione, sali di metalli (per esempio sodio, potassio, magnesio, calcio, eccetera) e sali di ammoniaca o ammine organiche.

"Farmaceuticamente accettabile" o "farmacologicamente accettabile" significa un materiale che non è indesiderabile biologicamente o in altro modo, *vale a dire* che il materiale può essere somministrato a un individuo senza causare effetti biologici indesiderabili o senza interagire in modo deleterio con uno qualsiasi dei componenti della composizione in cui è contenuto o con uno qualsiasi dei componenti presenti sul o nel corpo dell'individuo.

"Condizioni fisiologiche" si riferisce a condizioni nel corpo di un animale (per esempio un essere umano). Le condizioni fisiologiche includono, senza alcuna limitazione, la temperatura corporea e un ambiente acquoso di forza ionica fisiologica, pH ed enzimi. Le condizioni fisiologiche racchiudono anche condizioni nel corpo di un particolare soggetto che differiscono dalle condizioni "normali" presenti nella maggior parte dei soggetti, per esempio che differiscono dalla temperatura normale del corpo umano di approssimativamente 37 °C o che differiscono dal pH normale del sangue umano di approssimativamente 7,4.

Come usato nella presente, il termine "soggetto"

racchiude mammiferi e non mammiferi. Esempi di mammiferi includono, senza alcuna limitazione, qualsiasi membro della classe dei mammiferi: esseri umani, primati non umani come scimpanzé e altre scimmie e specie di scimmie; animali da fattoria quali bovini, equini, ovini, caprini, suini; animali domestici come conigli, cani e gatti; animali da laboratorio inclusi roditori, come ratti, topi e porcellini d'India, e simili. Esempi di non mammiferi includono, senza alcuna limitazione, uccelli, pesci e simili. Il termine non indica una particolare età o un particolare sesso.

Le espressioni "polietilenglicole", "PEG", "ossido di polietilene" e "PEO" sono usate nella presente in modo intercambiabile a meno che non sia indicato diversamente. Una variante di CNP coniugata tramite un gruppo amminico a un polimero "PEOn", associato al numero n, in generale ha la formula: $\text{CH}_3\text{-}[\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_n\text{-C(=O)-NHR}$, dove n è il numero di unità di ossido di etilene e R indica il resto del peptide. Il polimero "PEOn" può facoltativamente avere un gruppo alchilenico, $(\text{CH}_2)_m$, dove m è un numero intero da 1 a 5, tra il carbonio carbonilico e le unità ripetitive di ossido di etilene. Tale polimero "PEOn" (per esempio PE012 o PE024) è monodisperso, vale a dire che è un singolo polimero discreto di un particolare peso molecolare. Analogamente, una variante di CNP coniugata tramite un gruppo amminico a un polimero "PEGnK", associato al numero nK, in generale ha la formula: $\text{CH}_3\text{-}[\text{-O-}$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}]_p\text{-C(=O)-NHR}$, dove p è un numero intero maggiore di 1. Il polimero "PEGnK" può anche facoltativamente avere un gruppo alchilenico, $(\text{CH}_2)_m$, dove m è un numero intero da 1 a 5, tra il carbonio carbonilico e le unità ripetitive di ossido di etilene. Tuttavia, tale polimero "PEGnK" (per esempio PEG1K, PEG2K, PEG5K o PEG20K) è polidisperso, vale a dire che contiene una miscela di polimeri aventi una distribuzione di pesi molecolari, dove il numero nK indica il peso molecolare medio numerico del polimero (M_n) in kilo Dalton. Per esempio, "PEG2K" coniugato a una variante di CNP indica un polimero PEG polidisperso avente un peso molecolare medio numerico del polimero di circa 2 kDa.

Quando viene fornito un intervallo di massa di un polimero (per esempio PEG) (per esempio in unità di kDa), l'intervallo si riferisce a un intervallo di pesi molecolari medi numerici del polimero, non a un intervallo di pesi molecolari di più polimeri in una miscela polidispersa, a meno che non sia espressamente indicato altrimenti.

B. Peptidi di variante di CNP

L'uso di CNP-22 come agente terapeutico è limitato dalla sua breve emivita nel plasma (J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1428-35 (1994)). Nel plasma umano, la concentrazione di CNP-22 è tipicamente inferiore a cinque picomolari. CNP-22 viene degradato ed eliminato dalla circolazione mediante NEP e NPR-C nell'essere umano (Growth Hormone & IGF Res., 16: S6-S14). In

tutti gli studi condotti sull'essere umano e sugli animali con CNP-22 somministrato per via sistemica, è stata usata l'infusione continua per aumentare la concentrazione di CNP-22 nei soggetti. Un peptide CNP avente un'emivita più lunga e un livello di funzionalità almeno simile sarebbe vantaggioso per una strategia terapeutica basata su CNP. Peptidi di variante di CNP aventi proprietà migliorate sono divulgati nelle domande internazionali n. WO 2009/067639 e WO 2010/135541 e nei brevetti statunitensi n. 8,198,242, 8,598,121 e 8,377,884.

I peptidi di variante di CNP possono essere derivati di CNP-37 o CNP-38. I peptidi di variante di CNP-37 possono contenere una o più aggiunte di amminoacidi, delezioni e/o sostituzioni con uno o più amminoacidi o peptidomimetici naturali o non naturali (per esempio uno o più isosteri di legame peptidico) in una qualsiasi o più delle 37 posizioni di CNP-37. Esempi non limitativi di sostituzioni che possono essere fatte in CNP-37, sulla base della numerazione di CNP-22, includono K4R, G5S, G5R, G8S, K10R, G15S, S16Q, M17N, G19R e relative combinazioni.

I peptidi di variante di CNP possono essere peptidi CNP-37 o CNP-38 modificati aventi uno o più mutazioni/sostituzioni in corrispondenza del sito di clivaggio della furina, progettati per migliorare la resistenza *in vivo* alla proteasi furina, e/o contenenti glicina o prolina-glicina in corrispondenza dell'N-terminale, progettati per migliorare la

stabilità plasmatica e prevenire la formazione di piroglutammina. Varianti esemplificative di CNP-37 includono, senza alcuna limitazione:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N); ID SEQ N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37; ID SEQ N:2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; ID SEQ N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP-37 (M32N); ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37; ID SEQ N:5);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37; ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP-37 o CNP-38: ID SEQ N:7).

C. Sintesi e purificazione dei peptidi di variante di CNP

I peptidi di variante di CNP utili nella presente possono essere prodotti mediante espressione ricombinante, usando alcune tecniche note nella tecnica. Si veda, per esempio, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, seconda edizione. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); DNA Cloning: A Practical Approach, volumi I e II, D. N. Glover, Ed. (1985); e Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

I peptidi di variante di CNP possono essere prodotti mediante un processo ricombinante che comprende la coltivazione in un terreno di una cellula ospite comprendente un primo polinucleotide codificante un peptide di variante di CNP legato a un secondo polinucleotide codificante un peptide o una proteina clivabile in condizioni tali da determinare l'espressione di un polipeptide di fusione codificato dai polinucleotidi, in cui il polipeptide di fusione comprende il peptide di variante di CNP direttamente legato al peptide o alla proteina clivabile o indirettamente legato a esso/a tramite un linker. La cellula ospite può essere trasformata con un portatore di espressione comprendente il polinucleotide codificante il peptide di variante di CNP legato al polinucleotide codificante il peptide o la proteina clivabile. Il polipeptide di fusione può essere espresso come proteina solubile o come corpo di inclusione. Il polipeptide di fusione espresso può essere isolato dalla cellula ospite o dal terreno di coltura e il polipeptide di fusione isolato può essere messo in contatto con un agente di clivaggio per rilasciare il peptide di variante di CNP.

Metodi di produzione di peptidi di variante di CNP sono descritti nei brevetti statunitensi 8,198,242, 8,377,884 e 8,598,121.

Le cellule ospite usate per produrre i peptidi di

variante di CNP possono essere cellule di batteri, lieviti, insetti, vertebrati non mammiferi o mammiferi. Le cellule batteriche includono, senza alcuna limitazione, linee e ceppi cellulari di *E. coli*. Esempi non limitativi di linee e ceppi cellulari di *E. coli* includono BL21, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pGro7, ArcticExpress(DE3), C41 [denominato anche C41(DE3)], C43 [denominato anche C43(DE3)], Origami B(DE3), Origami B(DE3)pLysS, KRX e Tuner(DE3). I peptidi di variante di CNP e le proteine di fusione di CNP possono essere prodotti usando cellule BL21(DE3). Le cellule dei mammiferi includono, senza alcuna limitazione, cellule di criceto, scimmia, scimpanzé, cane, gatto, bovino, suino, topo, ratto, coniglio, ovino e umano. Le cellule ospite possono essere cellule immortalizzate (una linea cellulare) o cellule non immortalizzate (primarie o secondarie) e possono essere un'ampia varietà di tipologie cellulari, come, senza alcuna limitazione, fibroblasti, cheratinociti, cellule epiteliali (per esempio cellule epiteliali mammarie, cellule epiteliali intestinali), cellule ovariche (per esempio cellule ovariche di criceto cinese o CHO), cellule endoteliali, cellule gliali, cellule neurali, elementi formati del sangue (per esempio linfociti, cellule del midollo osseo), condrociti e altre cellule di derivazione ossea, e precursori di questi tipi di cellule somatiche. Le cellule ospite contenenti il DNA o l'RNA della variante di CNP sono coltivate in condizioni idonee alla

crescita delle cellule, all'espressione del DNA o dell'RNA e all'identificazione/alla selezione delle cellule che esprimono il peptide di variante di CNP.

I peptidi di variante di CNP possono essere espressi in modo ricombinante come proteine di fusione comprendenti un peptide di variante di CNP e una proteina vettore clivabile o un tag clivabile (per esempio un tag di peptide), in cui la proteina di fusione comprende il peptide di variante di CNP direttamente legato alla proteina vettore o al tag clivabile o indirettamente legato a essa/o attraverso un linker. L'uso di una proteina vettore o di un tag facilita, per esempio, la rilevazione, l'isolamento e/o la purificazione della proteina di fusione. Le proteine vettori e i tag clivabili includono, senza alcuna limitazione, i tag di istidina (per esempio esa-His); il fattore di trascrizione umano TAF12 (TAF12), i frammenti di TAF12, il dominio di piegatura dell'istone di TAF12, i mutanti di TAF12 e i relativi frammenti, TAF12(C/A), TAF12(D/E), TAF12(4D/4E), TAF12(6D/6E), TAF12(10D/10E), TAF12(C/A e D/E), TAF12(C/A e 4D/4E), TAF12(C/A e 6D/6E), TAF12(C/A e 10D/10E); la chetosteroido isomerasi (KSI); la proteina legante il maltosio (MBP); la β -galattosidasi (β -Gal); la glutatione-S-transferasi (GST); la tioredossina (Trx); il dominio legante la chitina (CBD); BMP-2, i mutanti di BMP-2, BMP-2 (C/A); SUMO; e i mutanti e i relativi frammenti.

I peptidi di variante di CNP descritti nella presente

possono essere sintetizzati usando un sintetizzatore peptidico e purificati secondo metodi noti nella tecnica, per esempio secondo i metodi di Atherton e Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach*, IRL Press (Oxford, England (1989)).

D. Metodi d'uso di peptidi di variante di CNP, composizioni farmaceutiche di peptidi di variante di CNP e vie di somministrazione

Metodi d'uso delle varianti di CNP

Patologie ossee/Displasia scheletrica

I fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) svolgono un ruolo importante nella formazione ossea e le mutazioni nei geni del recettore FGF (FGFR 1, 2 e 3) danno origine a svariate malformazioni scheletriche ereditarie (Curr. Biol., 5: 500-507 (1995)). Nel particolare, le mutazioni attivanti in FGFR-3 sono responsabili di disturbi delle ossa lunghe, tra cui l'acondroplasia, la forma più comune di nanismo genetico umano (Nature, 371: 252-254 (1994); Cell, 78: 335-342 (1994)), il disturbo più lieve ipocondroplasia (Ann. N.Y. Acad. Sci., 785: 182-187 (1996)) e la più grave displasia tanatofora (TD) tipo I e II, letale in epoca neonatale (Hum. Mol. Genet., 5: 509-512 (1996); Nat. Genet., 9: 321-328 (1995)). I modelli murini che sovraesprimono FGF-2, e di conseguenza attivano FGFR-3, mostrano ossa lunghe accorciate e macrocefalia (Mol. Biol. Cell, 6: 1861-73 (1995)). In accordo con questo modello, i topi

carenti di FGFR-3 mostrano una notevole crescita scheletrica eccessiva con piastre di crescita più larghe (Nature Genet., 12: 390-397 (1996)).

Stimolando la produzione di matrici, la proliferazione e la differenziazione di condrociti e l'aumento della crescita delle ossa lunghe, i peptidi di variante di CNP della divulgazione sono utili per il trattamento di mammiferi, incluso l'essere umano, affetti da una patologia ossea, come una displasia scheletrica. Esempi non limitativi di patologie ossee e displasie scheletriche sensibili al CNP includono acondroplasia, ipocondroplasia, bassa statura, nanismo, osteocondrodisplasie, displasia tanatofora, osteogenesi congenita, acondrogenesi, condrodisplasia congenita, acondroplasia omozigote, condrodisplasia congenita, displasia camptomelica, ipofosfatasia letale congenita, osteogenesi congenita tipo letale perinatale, sindromi costa corta-polidattilia, ipocondroplasia, condrodisplasia congenita tipo rizomelico, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia spondiloepifisaria congenita, atelosteogenesi, displasia diastrofica, femore corto congenito, displasia mesomelica tipo Langer, displasia mesomelica tipo Nievergelt, sindrome di Robinow, sindrome di Reinhardt, acrodisostosi, disostosi periferica, displasia di Kniest, fibrocondrogenesi, sindrome di Roberts, displasia acromesomelica, micromelia, sindrome di Morquio, sindrome di Kniest, displasia metatrofica e displasia

spondiloepimetafisaria e. Inoltre, le varianti di CNP sono utili come aggiunta o alternativa all'ormone della crescita per il trattamento della bassa statura idiopatica e di altre displasie scheletriche.

In aggiunta, i peptidi di variante di CNP sono utili per il trattamento di altre condizioni e disturbi legati alle ossa, come rachitismo, rachitismo ipofosfatemico [tra cui rachitismo ipofosfatemico legato all'X (denominato anche rachitismo resistente alla vitamina D) e rachitismo ipofosfatemico autosomico dominante] e osteomalacia [tra cui l'osteomalacia indotta da tumore (denominata anche osteomalacia oncogenica o osteomalacia ipofosfatemica oncogenica)].

I peptidi di variante di CNP e le composizioni e formulazioni comprendenti gli stessi della presente invenzione sono utili per migliorare uno o più dei sintomi o delle conseguenze fisiologiche di una displasia scheletrica, in cui il miglioramento può essere l'aumento della crescita assoluta, l'aumento della velocità di crescita, l'aumento della densità minerale ossea mediante tomografia computerizzata qualitativa (QCT), il miglioramento della morfologia della piastra di crescita, l'aumento della crescita delle ossa lunghe, il miglioramento della morfologia spinale, il miglioramento del range di movimento dell'articolazione del gomito e/o la diminuzione dell'apnea del sonno. A tale riguardo, si noti che i termini "migliorato", "miglioramento", "aumento",

"diminuzione" e i relativi equivalenti grammaticali sono tutti termini relativi che, quando usati in relazione a un sintomo o a una conseguenza fisiologica di uno stato di malattia, si riferiscono allo stato del sintomo o della conseguenza fisiologica della malattia dopo il trattamento con un peptide di variante di CNP (o una composizione o formulazione comprendente lo stesso) rispetto allo stesso sintomo o alla stessa conseguenza fisiologica della malattia prima del trattamento con un peptide di variante di CNP (o una composizione o formulazione comprendente lo stesso) (vale a dire rispetto al "basale"). Come descritto sopra, uno stato al "basale" può essere determinato o attraverso la misurazione dello stato nel soggetto prima del trattamento (che può essere successivamente confrontato con lo stato nello stesso soggetto dopo il trattamento), o attraverso la misurazione di tale stato in una popolazione di soggetti affetti dalla stessa afflizione che condividono caratteristiche uguali o simili (per esempio età, sesso e/o stato o progressione della malattia).

Aumento o ottimizzazione della velocità di crescita

Le composizioni e le formulazioni della presente invenzione possono anche essere somministrate allo scopo di ottimizzare o aumentare la velocità di crescita in un soggetto affetto da displasia scheletrica. In una forma di realizzazione preferita, il soggetto soffre di acondroplasia.

Le misurazioni della velocità di crescita nei soggetti

possono essere effettuate nel tempo usando tecniche standard ben note nella tecnica. Le misurazioni di parametri come l'altezza in piedi, l'altezza da seduto, il peso, la circonferenza della testa, la lunghezza della parte superiore del braccio, la lunghezza della parte inferiore del braccio (avambraccio), la lunghezza della parte superiore della gamba, la lunghezza della parte inferiore della gamba (dal ginocchio al piede), la lunghezza della mano (dal polso all'estremità delle dita) e/o la lunghezza del piede possono essere effettuate in un determinato periodo di tempo per determinare il tasso di crescita specifico misurato da un qualsiasi particolare parametro (vale a dire la velocità di crescita). Le misurazioni della velocità di crescita in un determinato periodo di tempo possono essere "annualizzate", in cui il tasso di crescita calcolato in un determinato periodo di tempo è convertito nel tasso di crescita previsto in un periodo di un anno. Le misurazioni della velocità di crescita in un soggetto prima del trattamento con un peptide di variante di CNP (vale a dire una velocità di crescita al "basale") possono essere confrontate con misurazioni della velocità di crescita durante o dopo il trattamento con un peptide di variante di CNP per determinare l'effetto del trattamento sulle variazioni della velocità di crescita nel soggetto. Una velocità di crescita al "basale" può anche essere determinata da una popolazione di soggetti dello stesso stato generale di età, sesso e malattia

dell'individuo trattato con un peptide di variante di CNP.

È possibile misurare quantitativamente i miglioramenti della velocità di crescita misurati mediante la valutazione di uno o più dei parametri descritti sopra (per esempio l'altezza in piedi, eccetera) indotti o provocati dal trattamento di un soggetto che ne ha bisogno con un peptide di variante di CNP (o una composizione o una formulazione comprendente lo stesso). A tale proposito, l'aumento o il miglioramento annualizzato della velocità di crescita di qualsiasi particolare parametro in un soggetto trattato con una variante di CNP (o una composizione o formulazione comprendente la stessa) può essere di almeno circa il 10%, il 15%, il 20%, il 25%, il 30%, il 35%, il 40%, il 45% o il 50% o più rispetto al valore basale. I metodi descritti nella presente possono dare come risultato un aumento annualizzato della velocità di crescita, misurata come altezza in piedi, di almeno circa il 10%, il 15%, il 20%, il 25%, il 30%, il 35%, il 40%, il 45% o il 50% o più rispetto al valore basale. I metodi descritti nella presente possono dare come risultato un aumento annualizzato della velocità di crescita misurata in base all'altezza da seduto, al peso, alla circonferenza della testa, alla lunghezza della parte superiore del braccio, alla lunghezza della parte inferiore del braccio (avambraccio), alla lunghezza della parte superiore della gamba, alla lunghezza della parte inferiore della gamba (dal ginocchio al piede), alla lunghezza della mano (dal polso

all'estremità delle dita) o alla lunghezza del piede di almeno circa il 10%, il 15%, il 20%, il 25%, il 30%, il 35%, il 40%, il 45% o il 50% o più rispetto al valore basale. Come descritto nella presente, il comparatore di valori basali può essere la velocità di crescita annualizzata misurata dal parametro specifico prima del trattamento dello stesso soggetto con un peptide di variante di CNP, oppure può essere la velocità di crescita determinata da una popolazione di soggetti dello stesso stato generale di età, sesso e malattia dell'individuo trattato con un peptide di variante di CNP.

Dati di antropometria relativi alla proporzionalità di alcuni segmenti corporei rispetto ad altri possono anche essere ottenuti da soggetti sia prima che dopo il trattamento con un peptide di variante di CNP per determinare se la somministrazione di un peptide di variante di CNP comporta modifiche di tale proporzionalità. Per esempio, i rapporti tra la lunghezza della parte superiore del corpo (dalla vita alla sommità della testa) e la lunghezza della parte inferiore del corpo (dalla vita ai piedi) possono essere calcolati sia prima del trattamento con un peptide di variante di CNP (vale a dire, valore basale), sia dopo il trattamento con un peptide di variante di CNP per determinare se il trattamento con il peptide di variante di CNP ha un effetto avverso sulla proporzionalità del corpo. I rapporti tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio o

tra la parte superiore della gamba e la parte inferiore della gamba (dal ginocchio al piede) possono anche essere calcolati e confrontati per determinare l'effetto del trattamento con il peptide di variante di CNP sulla proporzionalità corporea. La somministrazione di un peptide di variante di CNP a un soggetto può non comportare una variazione significativa della proporzionalità corporea misurata da un qualsiasi rapporto specifico rispetto al valore basale. A tale proposito, il trattamento con un peptide di variante di CNP, o una composizione o formulazione comprendente lo stesso, della presente invenzione può comportare una variazione di uno qualsiasi dei rapporti descritti sopra non superiore a 0,5, 0,25, 0,20, 0,15, 0,10 o 0,05, preferibilmente non superiore a 0,05.

Nei vari metodi descritti nella presente, è preferito che la somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso non comporti un evento avverso correlato al farmaco di studio di grado due o superiore, o di grado tre o superiore, nel soggetto trattato. A tale proposito, le tecniche di misurazione e classificazione di eventi fisiologici associati al trattamento di un soggetto con un composto, e un elenco degli eventi avversi classificati, sono disponibili all'indirizzo http://evs.nci.nih.gov/ftpl/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf.

Peraltro, nei vari metodi descritti nella presente, è preferito che la somministrazione del peptide di variante di CNP o della composizione o formulazione comprendente lo stesso non comporti una variazione clinicamente significativa (un aumento o una diminuzione rispetto al valore basale) di uno o più dei seguenti parametri fisiologici: concentrazione di emoglobina nel sangue, numero di piastrine nel sangue, concentrazione di elettroliti nel sangue, concentrazione di azoto ureico nel sangue, concentrazione di creatinina nel sangue, concentrazione di fosfatasi alcalina nel sangue, concentrazione di alanina aminotransferasi nel sangue o concentrazione di aspartato aminotransferasi nel sangue. "Variazione clinicamente significativa" significa una variazione di uno o più dei parametri di cui sopra per cui si osserva che dia come risultato una variazione fisiologica avversa rilevabile/osservabile dello stato di salute generale del soggetto.

Composizioni farmaceutiche e formulazioni di peptidi di variante di CNP

È anche divulgato l'uso di composizioni e formulazioni farmaceutiche comprendenti un peptide di variante di CNP, e uno o più eccipienti, vettori e/o diluenti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni possono ulteriormente comprendere uno o più altri agenti biologicamente attivi (per esempio inibitori di proteasi, recettore tirosin-chinasico e/o

recettore di clearance NPR-C).

Esempi non limitativi di eccipienti, vettori e diluenti includono veicoli, liquidi, tamponi, agenti di isotonicità, additivi, stabilizzatori, conservanti, solubilizzanti, tensioattivi, emulsionanti, agenti bagnanti, adiuvanti e così via. Le composizioni possono contenere liquidi (per esempio, acqua, etanolo); diluenti di vario contenuto di tampone (per esempio tamponi di Tris-HCl, fosfato, acetato, tamponi di citrato), pH e forza ionica; detergenti e agenti solubilizzanti (per esempio polisorbato 20, polisorbato 80); antiossidanti (per esempio metionina, acido ascorbico, metabisolfito di sodio); conservanti (per esempio Timerosol, alcool benzilico, m-cresolo); e sostanze di carica (per esempio lattosio, mannitolo, saccarosio). L'uso di eccipienti, diluenti e vettori nella formulazione di composizioni farmaceutiche è noto nella tecnica; si veda, *per esempio*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° edizione, pagine 1435-1712, Mack Publishing Co. (Easton, Pennsylvania (1990)).

Per esempio, i vettori includono, senza alcuna limitazione, diluenti, veicoli e adiuvanti, nonché vettori per impianti, e riempitivi solidi o liquidi inerti non tossici e materiali incapsulanti che non reagiscono con l'uno o i più principi attivi. Esempi non limitativi di vettori includono soluzione salina tamponata con fosfato, soluzione salina fisiologica, acqua ed emulsioni (*per esempio* emulsioni di

olio/acqua). Un vettore può essere un solvente o mezzo disperdente contenente, *per esempio*, etanolo, un poliolo (*per esempio* glicerolo, glicole propilenico, glicole polietilenico liquido e simili), un olio vegetale e relative miscele.

Le composizioni possono essere formulazioni liquide. Le formulazioni possono comprendere un peptide di variante di CNP in un intervallo di concentrazione da circa 0,1 mg/ml a circa 20 mg/ml, o da circa 0,5 mg/ml a circa 20 mg/ml, o da circa 1 mg/ml a circa 20 mg/ml, o da circa 0,1 mg/ml a circa 10 mg/ml, o da circa 0,5 mg/ml a circa 10 mg/ml, o da circa 1 mg/ml a circa 10 mg/ml, o da circa 2 mg/ml a circa 10 mg/ml, o da circa 2 mg/ml a circa 10 mg/ml. La formulazione può essere una formulazione liofilizzata oppure può essere una formulazione liquida precedentemente ricostituita a partire da una formulazione liofilizzata.

Le composizioni possono comprendere una soluzione tampone o un agente tampone per mantenere il pH di una soluzione o sospensione contenente CNP all'interno di un intervallo desiderato. Esempi non limitativi di soluzioni tampone includono soluzione salina tamponata con fosfato, soluzione salina tamponata con Tris e soluzione salina tamponata di Hank. Gli agenti tampone includono, senza alcuna limitazione, acetato di sodio, fosfato di sodio, acido citrico monoidrato e sodio citrato diidrato. Possono anche essere usate miscele di agenti tampone. L'agente tampone può essere acido acetico/acetato o

acido citrico/citrato. La quantità di agente tampone idonea in una composizione dipende in parte dal particolare tampone usato e dal pH desiderato della soluzione o sospensione. Per esempio, l'acetato è un tampone con pH più efficiente a pH 5 rispetto a pH 6, per cui in una soluzione a pH 5 può essere usato meno acetato rispetto a quanto a pH 6. L'agente tampone può avere una concentrazione di circa $10 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$. Il pH di una composizione può essere da circa pH 3 a circa pH 7,5, o da circa pH 3,5 a circa pH 7, o da circa pH 3,5 a circa pH 6,5, o da circa pH 4 a circa pH 6, o da circa pH 4 a circa pH 5, oppure è a circa $\text{pH } 5,0 \pm 1,0$, oppure è a circa $\text{pH } 5,5 \pm 1,0$.

Le composizioni possono contenere un agente di isotonicità per rendere la soluzione o sospensione isotonica e più compatibile per l'iniezione. Esempi non limitativi di agenti di isotonicità includono NaCl, trealosio, mannitolo, destrosio, glucosio, glicerina, sorbitolo, xilitolo ed etanolo. Per esempio, l'agente di isotonicità è trealosio o mannitolo, che possono essere impiegati singolarmente o in combinazione. Negli esempi specifici il trealosio o il mannitolo è in una concentrazione di circa $160 \pm 20 \text{ mM}$, o di circa $140 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$, o di circa $120 \pm 20 \text{ mM}$, o di circa $100 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$, o di circa $80 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$ o di circa $60 \text{ mM} \pm 20 \text{ mM}$.

Le composizioni possono comprendere un conservante. I conservanti includono, senza alcuna limitazione, m-cresolo e alcol benzilico. Il conservante può essere in una

concentrazione di circa $0,4\% \pm 0,2\%$, o di circa $1\% \pm 0,5\%$, o di circa $1,5\% \pm 0,5\%$ o di circa $2,0\% \pm 0,5\%$. In alternativa, la composizione o formulazione può non contenere un conservante.

Le composizioni possono contenere un agente anti-adsorbente (per esempio per mitigare l'adsorbimento di una variante di CNP su vetro o plastica). Gli agenti anti-adsorbenti includono, senza alcuna limitazione, alcool benzilico, polisorbato 20 e polisorbato 80. L'anti-adsorbente può essere in una concentrazione da circa $0,001\%$ a circa $0,5\%$, o da circa $0,01\%$ a circa $0,5\%$, o da circa $0,1\%$ a circa 1% , o da circa $0,5\%$ a circa 1% , o da circa $0,5\%$ a circa $1,5\%$, o da circa $0,5\%$ a circa 2% o da circa 1% a circa 2% .

Le composizioni possono comprendere uno stabilizzatore. Esempi non limitativi di stabilizzatori includono glicerina, glicerolo, tioglicerolo, metionina e acido ascorbico e relativi sali. Nel caso in cui lo stabilizzatore sia acido tioglicerolo o acido ascorbico o un relativo sale, lo stabilizzatore è preferibilmente in una concentrazione da circa $0,1\%$ a circa 1% .

Le composizioni possono contenere un antiossidante. Un antiossidante esemplificativo è, senza alcuna limitazione, l'acido ascorbico. Il rapporto molare tra antiossidante e peptide di variante di CNP può essere da circa $0,1:1$ a circa $15:1$, o da circa $1:1$ a circa $15:1$, o da circa $0,5:1$ a circa $10:1$, o da circa $1:1$ a circa $10:1$ o da circa $3:1$ a circa $10:1$.

Sali farmaceuticamente accettabili possono essere usati

nelle composizioni, che includono, senza alcuna limitazione, sali di acidi minerali (per esempio cloridrato, bromidrato, fosfato, solfato), sali di acidi organici (per esempio acetato, propionato, malonato, benzoato, mesilato, tosilato) e sali di ammine (per esempio isopropilammina, trimetilammina, dicicloesilammina, dietanolammina). È possibile reperire una disamina dettagliata dei sali farmaceuticamente accettabili in *Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° edizione, Mack Publishing Company, (Easton, Pennsylvania (1990))*.

Le formulazioni per la somministrazione parenterale possono essere preparate, *per esempio*, come soluzioni o sospensioni liquide, come forme solide adatte alla solubilizzazione o sospensione in un mezzo liquido prima dell'iniezione, o come emulsioni. Per esempio, le soluzioni e sospensioni iniettabili sterili possono essere formulate secondo le tecniche note nella tecnica usando idonei diluenti, vettori, solventi (*per esempio*, soluzione acquosa tamponata, soluzione di Ringer, soluzione isotonica di cloruro di sodio), agenti disperdenti, agenti bagnanti, agenti emulsionanti, agenti di sospensione e simili. In aggiunta, possono essere usati oli fissi sterili, esteri grassi, polioli e/o altri ingredienti inattivi. Come ulteriori esempi, le formulazioni per la somministrazione parenterale includono soluzioni iniettabili sterili acquose, che possono contenere antiossidanti, tamponi, agenti batteriostatici e soluti che

rendono la formulazione isotonica con il sangue del ricevente previsto; e sospensioni sterili acquose e non acquose, che possono contenere agenti di sospensione e agenti addensanti.

Formulazioni esemplificative contenenti il peptide CNP sono descritte nei brevetti statunitensi 8,198,242 e 8,598,121. È contemplato l'uso di formulazioni di CNP aventi un pH nell'intervallo da circa 4 a circa 6.

I peptidi di variante di CNP possono essere formulati in vettori farmaceutici per la somministrazione a soggetti affetti da displasia scheletrica. Le formulazioni liquide dei peptidi di variante di CNP possono essere formulate secondo una qualsiasi combinazione degli ingredienti e le loro quantità o concentrazioni sono descritte di seguito:

Classe dell'ingrediente	Ingrediente	Intervallo di concentrazione
Principio attivo	Peptide di variante di CNP	10 mg/ml \pm 9.9 mg/ml
Agente tampone	Acido acetico/acetato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente tampone	Acido citrico/citrato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente per regolare l'isotonicità	NaCl	140 mM \pm 20 mM
Agente per regolare l'isotonicità	Trealosio; mannitolo	10% \pm 5%
Conservante	m-Cresolo	0.4% \pm 0.1%, o 0.2%
Conservante/anti-adsorbente	Alcol benzilico	1.5% \pm 0.5%
Stabilizzatore	Glicerina (glicerolo)	5% - 100% (puro)
Stabilizzatore	Metionina	0.01% - 0.2%
Stabilizzatore	Acido ascorbico/sale di ascorbato	0.1% - 1%

Stabilizzatore	Tioglicerolo	0.1% - 1%
Anti-adsorbente	Polisorbato 20	0.001% - 0.5%
	Polisorbato 80	0.001% - 0.5%
	Alcol benzilico	0.5% - 1.5%

Le composizioni comprendenti un peptide di variante di CNP possono anche essere formulazioni liofilizzate. Le formulazioni liofilizzate possono comprendere un tampone e un agente di carica, e facoltativamente un antiossidante. Tamponi esemplificativi includono, senza alcuna limitazione, tamponi di acetato e tamponi di citrato. Agenti di carica esemplificativi includono, senza alcuna limitazione, mannitolo, saccarosio, destrano, lattosio, trealosio e povidone (PVP K24). In alcuni casi, il mannitolo e/o il trealosio possono essere in una quantità da circa il 3% a circa il 10%, o da circa il 4% a circa l'8%, o da circa il 4% a circa il 6%. In alcuni casi, il saccarosio può essere in una quantità da circa il 6% a circa il 20%, o da circa il 6% a circa il 15%, o da circa l'8% a circa il 12%.

Formulazioni liofilizzate di peptidi di variante di CNP possono essere preparate a partire da formulazioni formulate secondo una qualsiasi combinazione degli ingredienti e loro quantità o concentrazioni descritte di seguito:

Classe dell'ingrediente	Ingrediente	Intervallo di concentrazione
Principio attivo	Variante di CNP	10 mg/ml \pm 9.9 mg/ml
Agente tampone	Acido acetico/acetato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente tampone	Acido citrico/citrato	10 mM \pm 5 mM, o pH 5 \pm 1
Agente per regolare	Sorbitolo	5% \pm 3%

l'isotonicità/agente di carica		
Agente per regolare l'isotonicità/agente di carica	Mannitolo/Trealosio	5% ± 3%
Agente per regolare l'isotonicità/agente di carica	Saccarosio	10% ± 5%
Conservante	m-Cresolo	0.4% ± 0.2%
Conservante/anti-adsorbente	Alcol benzilico	1.5% ± 0.5%
Stabilizzatore	Glicerina (glicerolo)	5% - 100% (puro)
Stabilizzatore	Metionina	0.01% - 0.2%
Stabilizzatore	Acido ascorbico/sale di ascorbato	0.1% - 1%
Stabilizzatore	Tioglicerolo	0.1% - 1%
Anti-adsorbente	Polisorbato 20	0.001% - 0.5%
	Polisorbato 80	0.001% - 0.5%
	Alcol benzilico	0.5% - 1.5%

In vari casi, una formulazione comprendente un peptide di variante di CNP ha un pH di circa 3-7, o di circa 3-6, o di circa 3,5-6,5, o di circa 4-6, o di circa 4-5, o di circa 4,5-5,5. In alcuni casi, per pH 4-5,5 un agente tampone idoneo è l'acido acetico/acetato (per esempio acetato di sodio), e per pH 5,5-6 un agente tampone idoneo è l'acido citrico/citrato. L'acido citrico/citrato (per esempio il citrato di sodio) è anche un agente tampone idoneo nell'intervallo di pH 3-6 o pH 4-6. In alcuni casi, l'agente tampone ha una concentrazione nella formulazione di circa 2-50 mM, o circa 2-40 mM, o circa 2-30 mM, o circa 5-30 mM, o circa 2-20 mM, o circa 5-20 mM, o circa 5-15 mM.

Inoltre, per minimizzare o evitare la deammidazione di un peptide di variante di CNP, l'acqua può essere rimossa dalla

formulazione mediante liofilizzazione. Le formulazioni liofilizzate possono contenere qualsiasi combinazione dei seguenti componenti: tampone: acetato di sodio e acido acetico, o citrato di sodio e acido citrico; isotonicità/agente di carica: mannitolo (per esempio 3-10%, 2-8% o 4-6%); saccarosio (per esempio 6-20%, 5-15% o 8-12%); antiossidanti: metionina e/o acido ascorbico con rapporto in moli di ciascun antiossidante rispetto al peptide di variante di CNP da circa 0,1:1 a circa 1:1, o da circa 0,5:1 a circa 5:1, o da circa 1:1 a circa 15:1, o da circa 1:1 a circa 10:1, o da circa 3:1 a circa 10:1.

La deammidazione può anche essere minimizzata o evitata conservando una composizione di CNP (per esempio una formulazione liquida o una formulazione liofilizzata) a temperatura più bassa, per esempio a circa 5 °C, 0 °C, -10 °C, -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C o -100 °C.

Per minimizzare o evitare l'ossidazione dei residui ossidabili (per esempio, metionina) in un peptide di variante di CNP, la variante può essere formulata con uno o più antiossidanti. Antiossidanti esemplificativi includono, senza alcuna limitazione, metionina, acido ascorbico e tioglicerolo. L'ossidazione, per esempio, dei residui di metionina può anche essere minimizzata o impedita spurgando l'ossigeno da un mezzo liquido (se una formulazione liquida) con azoto o argon, e/o

spurgando l'ossigeno da un contenitore o una confezione con azoto o argon.

Al fine di minimizzare o prevenire l'adsorbimento (per esempio l'adsorbimento di un peptide variante di CNP su plastica o vetro), il polisorbato 20, il polisorbato 80 o l'alcool benzilico, o una relativa combinazione, possono essere aggiunti a una formulazione di CNP. Ciascuno degli uno o più anti-adsorbenti può essere in una concentrazione da circa 0,001% a circa 0,5%, o da circa 0,01% a circa 0,5%, o da circa 0,1% a circa 1%, o da circa 0,5% a circa 1%, o da circa 0,5% a circa 1,5%, o da circa 0,5% a circa 2% o da circa 1% a circa 2%. Uno o più intervalli esemplificativi di uno o più anti-adsorbenti nella formulazione includono, senza alcuna limitazione, da circa lo 0,001% a circa lo 0,5% di polisorbato 20, da circa lo 0,001% a circa lo 0,5% di polisorbato 80 e/o da circa lo 0,5% a circa l'1,5% di alcool benzilico

La divulgazione fornisce anche kit contenenti, per esempio, flaconi, fiale, ampolle, tubi, cartucce e/o siringhe che comprendono una formulazione liquida (per esempio iniettabile sterile) o una formulazione solida (per esempio liofilizzata). I kit possono anche contenere veicoli o vettori farmaceuticamente accettabili (per esempio solventi, soluzioni e/o tamponi) per la ricostituzione di una formulazione solida (per esempio liofilizzata) in una soluzione o sospensione per la somministrazione (per esempio, per iniezione), che includono

senza limitazione la ricostituzione di una formulazione liofilizzata in una siringa per iniezione o per diluire il concentrato a una concentrazione inferiore. Per di più, soluzioni e sospensioni iniettabili estemporanee possono essere preparate, per esempio, da polvere sterile, granuli o compresse comprendenti una composizione contenente CNP. I kit possono anche includere dispositivi di erogazione, come dispositivi di erogazione ad aerosol o iniezione, iniettori a penna, autoiniettori, iniettori senza ago, siringhe e/o aghi.

Dosaggi e frequenza di dosaggio

Come usato nella presente, l'espressione "quantità terapeuticamente efficace" di un agente attivo (per esempio un peptide di variante di CNP) si riferisce a una quantità che fornisce un beneficio terapeutico a un paziente. La quantità può variare da un individuo all'altro e può dipendere da una serie di fattori, tra cui la condizione fisica generale del paziente. Una quantità terapeuticamente efficace di un peptide di variante di CNP può essere prontamente accertata da un esperto nella tecnica, usando materiali e procedure disponibili al pubblico. Per esempio, la quantità di un peptide di variante di CNP usata per la terapia dovrebbe fornire un tasso di crescita accettabile in base a grafici di crescita per bambini di età compresa tra 0 e 17 anni affetti da acondroplasia (214 femmine e 189 maschi), che elencano l'altezza per età, la circonferenza della testa e la crescita segmentale (Horton WA

et al., Standard growth curves for achondroplasia, J. Pediatr., 93: 435-8 (1978)). I grafici CDC possono essere usati per valutare il peso per età e il peso per altezza o il BMI per età. Possono anche essere misurati risultati secondari con corsi che sono più cronici in natura.

La frequenza di dosaggio per un particolare individuo può variare a seconda di vari fattori, tra cui il disturbo da trattare e la condizione e la risposta dell'individuo alla terapia. Una composizione farmaceutica contenente un peptide di variante di CNP può essere somministrata a un soggetto circa una volta al giorno, una volta ogni due giorni, una volta ogni tre giorni o una volta alla settimana, due volte alla settimana, tre volte alla settimana, una volta ogni due settimane o mensilmente. Per il trattamento di disturbi legati alle ossa (per esempio displasie scheletriche, inclusa l'achondroplasia), una dose giornaliera o settimanale di un peptide di variante di CNP può essere somministrata ai pazienti fino a e/o durante l'età adulta.

I peptidi di variante di CNP descritti nella presente possono essere somministrati a una dose nell'intervallo da circa 5 o 10 nmol/kg a circa 300 nmol/kg, oppure da circa 20 nmol/kg a circa 200 nmol/kg. Per esempio, i peptidi di variante di CNP possono essere somministrati a una dose di circa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170, 175, 180, 190,

200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 o 2000 nmol/kg o altra dose ritenuta appropriata dal medico curante. In altri casi, i peptidi di variante di CNP possono essere somministrati a una dose di circa 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 µg/kg, o circa 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 o 10 mg/kg, o un'altra dose ritenuta appropriata dal medico curante. Il peptide di variante di CNP può essere somministrato a una dose da circa 7,5 a 100 µg/kg, o da circa 15 a 75 µg/kg, o da circa 15 a 30 µg/kg, o di circa 2,5 µg/kg, 7,5 µg/kg, 15,0 µg/kg, 30,0 µg/kg o 60,0 µg/kg. Le dosi dei peptidi di variante di CNP descritte nella presente possono essere somministrate secondo la frequenza di dosaggio/frequenza di somministrazione descritta nella presente, tra cui, senza alcuna limitazione, quotidianamente, 2 o 3 volte alla settimana, settimanalmente, ogni 2 settimane, ogni 3 settimane, mensilmente, eccetera. La somministrazione di un peptide di variante di CNP può avvenire per un periodo di tempo prolungato, in alcuni casi per un mese, tre mesi, sei mesi o più.

La frequenza di dosaggio/somministrazione di un peptide di variante di CNP per un particolare soggetto può variare in funzione di vari fattori, tra cui il disturbo da trattare e la

condizione e la risposta del soggetto alla terapia. Il peptide di variante di CNP può essere somministrato in dose singola o in più dosi per ogni dosaggio. In alcuni casi, il peptide di variante di CNP può essere somministrato, in dose singola o in più dosi, giornalmente, a giorni alterni, ogni 3 giorni, 2 volte alla settimana, 3 volte alla settimana, settimanalmente, ogni due settimane, ogni 3 settimane, mensilmente, ogni 6 settimane, ogni 2 mesi, ogni 3 mesi o come ritenuto opportuno dal medico curante.

Un peptide di variante di CNP può essere somministrato in modo da consentire periodi di crescita (per esempio, condrogenesi) seguiti da un periodo di recupero (per esempio, osteogenesi). Per esempio, il peptide di variante di CNP può essere somministrato per via intravenosa, sottocutanea, intra-articolare o con un'altra modalità quotidianamente o più volte alla settimana per un periodo di tempo, seguito da un periodo di assenza di trattamento, quindi il ciclo viene ripetuto. Il periodo iniziale di trattamento (per esempio la somministrazione del peptide di variante di CNP giornalmente o più volte alla settimana) può essere di 3 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, 4 settimane, 5 settimane, 6 settimane, 7 settimane, 8 settimane, 9 settimane, 10 settimane, 11 settimane o 12 settimane. Il periodo di assenza di trattamento può durare 3 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane o 4 settimane. Il regime di dosaggio del peptide di

variante di CNP può essere giornaliero per 3 giorni seguito da 3 giorni di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 1 settimana seguito da 3 giorni o 1 settimana di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 2 settimane seguito da 1 o 2 settimane di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 3 settimane seguito da 1, 2 o 3 settimane di riposo; oppure giornaliero o più volte alla settimana per 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 settimane seguito da 1, 2, 3 o 4 settimane di riposo.

Modalità di somministrazione

I peptidi di variante di CNP, o le composizioni o formulazioni farmaceutiche che li comprendono, possono essere somministrati a soggetti in vari modi quali, per esempio, mediante iniezione per via sottocutanea, intra-articolare, intravenosa, intra-arteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, intradermica o intratecale. I peptidi di variante di CNP possono essere somministrati mediante una singola iniezione sottocutanea, intra-articolare, intravenosa, intra-arteriosa, intraperitoneale, intramuscolare, intradermica o intratecale una volta al giorno, a giorni alterni, una volta ogni tre giorni o una volta alla settimana.

I peptidi di variante di CNP possono anche essere somministrati per iniezione diretta nel sito della malattia o in prossimità di esso. Inoltre, i peptidi di variante di CNP possono essere somministrati mediante impianto di un deposito

nel sito d'azione bersaglio (per esempio un'area articolare o cartilaginea anomala o degenerata). In alternativa, i peptidi di variante di CNP possono essere somministrati per via sublinguale sotto la lingua (per esempio, compressa sublinguale) o per inalazione nei polmoni (per esempio, inalatore o spray aerosol), per erogazione nella cavità nasale (per esempio, spray intranasale), per erogazione nell'occhio (per esempio, collirio) o per erogazione transdermica (per esempio, mediante un cerotto sulla pelle). I peptidi di variante di CNP possono anche essere somministrati per via orale sotto forma di microsfele, microcapsule, liposomi (non caricati o caricati (per esempio cationici)), microparticelle polimeriche (per esempio poliammidi, polilattide, poliglicolide, poli(lactide-glicolide)), microemulsioni e simili.

Un ulteriore metodo di somministrazione è quello mediante pompa osmotica (per esempio una pompa Alzet) o mini-pompa (per esempio una pompa mini-osmotica Alzet), che consente un'erogazione a rilascio controllato, continuo e/o lento del peptide di variante di CNP o della composizione farmaceutica per un periodo di tempo predeterminato. La pompa osmotica o mini-pompa può essere impiantata per via sottocutanea, oppure in prossimità del sito bersaglio (per esempio, le ossa lunghe degli arti, le epifisi, eccetera).

Sarà evidente a un esperto nella tecnica che i peptidi di

variante di CNP o le relative composizioni possono essere somministrati/e anche con altre modalità. La determinazione della modalità di somministrazione più efficace dei peptidi di variante di CNP o delle relative composizioni rientra nelle capacità del tecnico esperto

Aspetti e dettagli aggiuntivi della divulgazione risulteranno evidenti dai seguenti esempi, che sono da intendersi come illustrativi piuttosto che limitativi.

E. Esempi

Esempio 1 - Dati di studi clinici su esseri umani per sei mesi per pazienti affetti da acondroplasia

Al fine di determinare l'effetto dei peptidi di variante di CNP sui sintomi della displasia scheletrica, come l'acondroplasia, e sulla crescita delle ossa lunghe e/o sulla velocità di crescita (misurata dal tasso di aumento dell'altezza in piedi del paziente dopo il trattamento rispetto a prima del trattamento) in pazienti affetti da acondroplasia, sono stati condotti studi di incremento della dose in bambini affetti da acondroplasia (ACH) di età compresa tra 5 e 14 anni (inclusi) che hanno documentato l'ACH, come documentato da motivazioni cliniche e confermato dall'esecuzione di test genetici.

Prima della somministrazione di una formulazione comprendente un peptide di variante di CNP come descritto nella presente, sono state raccolte a intervalli di tre mesi

misurazioni seriali di crescita (su una varietà di diversi parametri) e misurazioni del tasso di velocità crescita (almeno in altezza in piedi del paziente) da pazienti di studio non trattati per stabilire i livelli basali di velocità di crescita e i rapporti di proporzionalità corporea come descritto in precedenza. Una volta ottenuti i livelli basali di velocità di crescita e i rapporti di proporzionalità corporea, è stata quindi somministrata una formulazione comprendente un peptide di variante di CNP (in particolare Pro-Gly-CNP-37; ID SEQ N:5) come dose giornaliera per via sottocutanea in uno dei seguenti regimi posologici giornalieri: coorte 1 (n=8): dose giornaliera di 2,5 µg/kg del peptide Pro-Gly-CNP-37, coorte 2 (n=8), dose giornaliera di 7,5 µg/kg del peptide Pro-Gly-CNP-37; coorte 3 (n=10), dose giornaliera di 15,0 µg/kg del peptide Pro-Gly-CNP-37. La somministrazione sottocutanea giornaliera è stata effettuata per 6 mesi.

Più in particolare, il peptide Pro-Gly-CNP-37 è stato formulato in una composizione sterile priva di conservanti comprendente 2,0 mg/ml o 10 mg/ml del peptide CNP in combinazione con 0,28 mg/ml di acido citrico monoidrato, 1,08 mg/ml di sodio citrato diidrato, 58,01 mg/ml di trealosio diidrato, 15 mg/ml di D-mannitolo, 0,73 mg/ml di L-metionina e 0,05 mg/ml di polisorbato 80, pH 5,5. Tale composizione liquida è stata ricostituita a partire da una formulazione originariamente liofilizzata comprendente i componenti

descritti ed è stata fornita in una fiala sterile monouso di vetro borosilicato trasparente di tipo I non trattato. Questa formulazione liquida ricostituita è stata impiegata in tutti gli studi clinici di trattamento umano descritti nella presente.

Durante il corso della somministrazione del peptide di variante di CNP sono state effettuate varie valutazioni, tra cui il peso corporeo, la misurazione della lunghezza ossea e della crescita ossea, tra cui il calcolo del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio, del rapporto tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba e del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo. Le misurazioni della velocità di crescita sono state calcolate anche misurando l'altezza in piedi dei pazienti, e i dati sono stati confrontati con i tassi di velocità di crescita basali ottenuti in precedenza. Le valutazioni sono state effettuate approssimativamente ai giorni 15, 22, 29, 43, 85, 127 e 183 dalla prima somministrazione del peptide di variante di CNP.

I dati di valutazione di imaging esplorativo includevano misurazioni e morfologia della colonna vertebrale, delle ossa lunghe e delle estremità, nonché misurazioni della piastra di crescita, dell'età ossea e della densità minerale ossea. I

saggi includono raggi X anteriori-posteriori (AP) del bacino per la valutazione basale dell'anca; radiografie posteriori-anteriori (PA) della mano sinistra e del polso per valutare l'età ossea (Greulich, 1971, Stanford University Press.); (Tanner, 1975, Academic Press.), piastre di crescita, lunghezza della mano e spessore corticale; radiografie AP degli arti inferiori per valutare le piastre di crescita, la lunghezza tibiale, lo spessore corticale e l'inarcamento, radiografie AP della colonna lombare per valutare la distanza interpedicolare trasversale. Sono eseguite radiografie laterali della colonna lombare per valutare l'angolo di lordosi toraco-lombare, la morfologia vertebrale nonché altri potenziali cambiamenti legati alla stenosi spinale, la scansione mediante QCT dell'avambraccio e della tibia per valutare la densità minerale ossea, la morfologia della piastra di crescita e la lunghezza ossea. Questa scansione può essere acquisita con uno scanner CT standard, un fantoccio di calibrazione e un software designato, usando un protocollo a bassa dose di radiazione predeterminato, che evita la radiazione diretta sulla testa e sul busto.

Studio del sonno: l'apnea del sonno non trattata durante l'infanzia è stata ripetutamente associata a scarsi risultati funzionali e di salute, tra cui impatti negativi su alcuni aspetti dello sviluppo del bambino come il comportamento e l'apprendimento. I deficit cognitivi indicati come associati all'apnea del sonno nei bambini includono l'apprendimento, la

memoria e le abilità visive-spaziali; il linguaggio, la fluenza verbale, le prestazioni scolastiche e le funzioni esecutive. In aggiunta, la respirazione pediatrica disturbata dal sonno è stata associata ad anomalie della crescita; alterazioni della salute cardiaca, incluse la pressione sanguigna sia sistolica che diastolica, la regolazione autonoma, l'ossigenazione cerebrale e il flusso ematico cerebrale, suggerendo che la sindrome da apnea del sonno ostruttiva infantile possa mettere in pericolo la salute cardiovascolare a lungo termine; e marcatori sistemici di infiammazione (Marcus, 2012, Pediatrics). Un dispositivo per l'esecuzione di test del sonno viene usato per valutare la presenza e la gravità della respirazione interrotta dal sonno misurando la saturazione di ossigeno nel sangue, la frequenza cardiaca e il flusso d'aria durante il monitoraggio notturno. La valutazione dell'apnea del sonno include, senza alcuna limitazione, la determinazione del numero di episodi di apnea e ipopnea all'ora (Apnea/Hypopnea Index, AHI).

Le misure di flessione-estensione del range di movimento dell'articolazione del gomito sono misurate con un goniometro.

I biomarcatori sono valutati mediante la variazione rispetto al valore basale e includono, senza alcuna limitazione, la valutazione del turnover della cartilagine (CTX-II), l'attività di condrociti e osteoblasti (fosfatasi alcalina specifica dell'osso), la formazione ossea (P1NP), il

turnover osseo (osteocalcina); e i marcatori della bioattività di CNP (cGMP, NT-proCNP e ANP) nonché biomarcatori aggiuntivi. I campioni per i marcatori biochimici epatici e urinari del collagene e del turnover osseo, e per i marcatori dell'attività di CNP, vengono raccolti nei punti temporali designati.

Risultati: La variazione della velocità di crescita conseguente al trattamento con il peptide di variante di CNP Pro-Gly-CNP-37 è stata misurata nella coorte 1 (2,5 µg/kg/giorno), coorte 2 (7,5 µg/kg/giorno) e coorte 3 (15 µg/kg/giorno) per un totale di 26 pazienti misurando le variazioni dell'altezza in piedi durante il trattamento e confrontandole con i tassi di velocità di crescita basali misurati prima del trattamento. La variazione media della velocità di crescita dell'altezza in piedi nel corso dello studio di 6 mesi è riassunta nella tabella 1. Come dimostrato nella tabella 1, non è stato osservato un aumento significativo della velocità di crescita nei pazienti affetti da acondroplasia trattati con 2,5 µg/kg/giorno di Pro-Gly-CNP-37 per 6 mesi (coorte 1). Al contrario dei pazienti della coorte 1, tuttavia, i pazienti con acondroplasia trattati con 7,5 µg/kg/giorno di Pro-Gly-CNP-37 per 6 mesi (coorte 2) hanno dimostrato un aumento statisticamente significativo (valore di $p = 0,04$) della velocità di crescita dell'altezza in piedi (rispetto al loro tasso di velocità di crescita basale dell'altezza in piedi calcolato in precedenza). Più in

particolare, i pazienti nella coorte 2 hanno mostrato un aumento medio della velocità di crescita dell'altezza in piedi di 1,3 cm/anno, che rappresenta un aumento della velocità di crescita annualizzata del 45% al di sopra del valore basale. Infine, i pazienti con acondroplasia trattati con 15 µg/kg/giorno di Pro-Gly-CNP-37 per 6 mesi (coorte 3) hanno dimostrato anch'essi un aumento statisticamente significativo (valore di $p = 0,01$) della velocità di crescita dell'altezza in piedi (rispetto al loro tasso di velocità di crescita basale dell'altezza in piedi calcolato in precedenza). Più in particolare, i pazienti nella coorte 3 hanno mostrato un aumento medio della velocità di crescita dell'altezza in piedi di 2,0 cm/anno, che rappresenta un aumento della velocità di crescita annualizzata del 50% al di sopra del valore basale. Questi dati dimostrano che il trattamento sottocutaneo giornaliero di pazienti affetti da acondroplasia con almeno 7,5 µg/kg di un peptide di variante di CNP per un periodo di 6 mesi o superiore ha un effetto benefico sulla crescita ossea, sulla velocità di crescita e, in generale, sul trattamento dei sintomi dell'acondroplasia.

Tabella 1

Analisi di efficacia: velocità di crescita annualizzata di 6 mesi			
Velocità di crescita	Coorte 1 2.5 µg/kg/ giorno (n=8*)	Coorte 2 7.5 µg/kg/ giorno (n=8)	Coorte 3 15 µg/kg/ giorno (n=10)
Valore basale Media (cm/anno)	3.8	2.9	4.0
Post-trattamento Media (cm/anno)	3.4	4.2	6.1
Variazione rispetto al valore basale Media (cm/anno)	-0.4	1.3	2.0
Intervallo di confidenza al 95% (cm/anno)	-1.8, 1.1	0.1, 2.5	0.6, 3.4
Valore p**	0.56	0.04	0.01
Aumento percentuale dal valore basale In base alle medie (%)	NM	45	50

Proporzionalità corporea. Per tutti i pazienti di tutte le coorti sono stati calcolati i rapporti di proporzionalità corporea (tra lunghezza della parte superiore del corpo e lunghezza della parte inferiore del corpo, lunghezza della parte superiore del braccio e lunghezza dell'avambraccio, e lunghezza della parte superiore della gamba e lunghezza della parte inferiore della gamba [dal ginocchio al piede]) sia prima del trattamento (valore basale) che durante il corso del trattamento con il peptide di variante di CNP.

Per la coorte 1, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza

dell'avambraccio e il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba erano rispettivamente 2,09, 1,13 e 0,67. Dopo 6 mesi di trattamento sottocutaneo giornaliero con 2,5 µg/kg del peptide di variante di CNP, sono stati determinati gli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a 2,07, 1,11 e 0,67, che rappresentano le variazioni medie di quegli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a -0,02, -0,02 e 0,0.

Per la coorte 2, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio e il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba erano rispettivamente 2,03, 1,14 e 0,66. Dopo 6 mesi di trattamento sottocutaneo giornaliero con 7,5 µg/kg del peptide di variante di CNP, sono stati determinati gli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a 2,03, 1,14 e 0,66, che rappresentano le variazioni medie di quegli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a 0,0, 0,0 e 0,0.

Per la coorte 3, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo, il rapporto basale medio tra la

lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio e il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba erano rispettivamente 1,91, 1,13 e 0,69. Dopo 6 mesi di trattamento sottocutaneo giornaliero con 15 µg/kg del peptide di variante di CNP, sono stati determinati gli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a 1,89, 1,08 e 0,69, che rappresentano le variazioni medie di quegli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a -0,02, -0,05 e 0,0.

Questi dati dimostrano che il trattamento di pazienti affetti da acondroplasia con un peptide di variante di CNP non ha alcun effetto avverso significativo sulla proporzionalità corporea complessiva, in quanto tutte le variazioni del rapporto di proporzionalità corporea misurate sono scese tra -0,05 e 0,05, rispetto al valore basale, dopo 6 mesi di trattamento con il peptide di variante di CNP.

Eventi avversi. Tutti i pazienti di ciascuna delle coorti descritte sopra sono stati regolarmente valutati relativamente alla presenza di eventi avversi (come definito da http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf) causati in particolare dal trattamento con il peptide di variante di CNP. Nessun paziente in nessuna delle tre coorti di studio ha evidenziato un evento avverso di grado due o superiore che è stato determinato essere

correlato al farmaco di studio, dimostrando che il trattamento di pazienti con acondroplasia con peptidi di variante di CNP non dà come risultato eventi fisiologici avversi gravi.

Peraltro, tutti i pazienti in ciascuna coorte di studio sono stati regolarmente monitorati relativamente alla concentrazione di emoglobina nel sangue, al numero di piastrine nel sangue, alla concentrazione di elettroliti nel sangue, alla concentrazione di azoto ureico nel sangue, alla concentrazione di creatinina nel sangue, alla concentrazione di fosfatasi alcalina nel sangue, alla concentrazione di alanina aminotransferasi nel sangue o alla concentrazione di aspartato aminotransferasi nel sangue. I dati ottenuti da ciascuna delle tre coorti di studio hanno dimostrato che non sono stati osservati cambiamenti clinicamente significativi in nessuno degli indicatori di sicurezza descritti sopra, confermando ancora una volta la sicurezza di base per la terapia con il peptide di variante di CNP per l'acondroplasia e i sintomi associati.

Esempio 2 - Dati di studi clinici su esseri umani per dodici mesi per l'acondroplasia (coorte 3)

Dopo il primo periodo di trattamento e valutazione dello studio clinico di 6 mesi, i 10 pazienti affetti da acondroplasia appartenenti alla coorte 3 descritta nell'esempio 1 riportato sopra hanno continuato con il regime clinico di 15 µg/ml di Pro-Gly-CNP-37 somministrato quotidianamente per via

sottocutanea per ulteriori 6 mesi (12 mesi totali). Durante il periodo di trattamento aggiuntivo di sei mesi sono state effettuate varie valutazioni, tra cui il peso corporeo, la misurazione della lunghezza ossea e della crescita ossea, tra cui il calcolo del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio, del rapporto tra la lunghezza della parte superiore della gamba e lunghezza della parte inferiore della gamba e del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo. Le misurazioni della velocità di crescita sono state calcolate anche misurando l'altezza in piedi dei pazienti, e i dati sono stati confrontati con i tassi di velocità di crescita basali ottenuti in precedenza.

Risultati: La variazione della velocità di crescita conseguente al trattamento per 12 mesi con il peptide di variante di CNP Pro-Gly-CNP-37 è stata misurata nella coorte 3 (15 µg/kg/giorno) per un totale di 10 pazienti misurando le variazioni dell'altezza in piedi durante il trattamento e confrontandole con i tassi di velocità di crescita basali misurati prima del trattamento. I dati ottenuti da questo studio di 12 mesi hanno dimostrato che i pazienti con acondroplasia trattati con 15 µg/kg/giorno di Pro-Gly-CNP-37 per 12 mesi (coorte 3) hanno dimostrato un aumento statisticamente significativo (valore di $p = 0,017$) della velocità di crescita dell'altezza in piedi (rispetto al loro

tasso di velocità di crescita basale dell'altezza in piedi calcolato in precedenza). Più in particolare, i pazienti nella coorte 3 hanno mostrato un aumento medio della velocità di crescita dell'altezza in piedi di 1,9 cm/anno, che rappresenta un aumento della velocità di crescita annualizzata di più del 47% al di sopra del valore basale. Questi dati dimostrano che il trattamento sottocutaneo giornaliero di pazienti affetti da acondroplasia con almeno 15 µg/kg di un peptide di variante di CNP per un periodo di 12 mesi o superiore ha un effetto benefico sulla crescita ossea, sulla velocità di crescita e, in generale, sul trattamento dei sintomi dell'acondroplasia.

Proporzionalità corporea. Per i 10 pazienti nella coorte 3 sono stati calcolati i rapporti di proporzionalità corporea (tra lunghezza della parte superiore del corpo e lunghezza della parte inferiore del corpo, lunghezza della parte superiore del braccio e lunghezza dell'avambraccio, e lunghezza della parte superiore della gamba e lunghezza della parte inferiore della gamba [dal ginocchio al piede]) sia prima del trattamento (valore basale) che durante il corso del trattamento con il peptide di variante di CNP.

Per la coorte 3, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo, il rapporto basale medio tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio e il rapporto basale medio tra la lunghezza

della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba erano rispettivamente 1,91, 1,13 e 0,69. Dopo 6 mesi di trattamento sottocutaneo giornaliero con 15 µg/kg del peptide di variante di CNP, sono stati determinati gli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a 1,88, 1,16 e 0,69, che rappresentano le variazioni medie di quegli stessi rapporti di proporzione corporea pari rispettivamente a -0,03, 0,03 e 0,0.

Questi dati dimostrano che il trattamento di pazienti affetti da acondroplasia con un peptide di variante di CNP non ha alcun effetto avverso significativo sulla proporzionalità corporea complessiva, in quanto tutte le variazioni del rapporto di proporzionalità corporea misurate sono scese tra -0,05 e 0,05, rispetto al valore basale, dopo 12 mesi di trattamento con il peptide di variante di CNP.

Eventi avversi. Tutti i pazienti della coorte 3 sono stati regolarmente valutati relativamente alla presenza di eventi avversi (come definito da http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf) causati in particolare dal trattamento con il peptide di variante di CNP durante il corso del trattamento. Nessun paziente della coorte 3 ha evidenziato un evento avverso di grado due o superiore che è stato determinato essere correlato al farmaco di studio, dimostrando che il trattamento di pazienti con acondroplasia con peptidi di

variante di CNP non dà come risultato eventi fisiologici avversi gravi.

Peraltro, tutti i pazienti della coorte 3 sono stati regolarmente monitorati relativamente alla concentrazione di emoglobina nel sangue, al numero di piastrine nel sangue, alla concentrazione di elettroliti nel sangue, alla concentrazione di azoto ureico nel sangue, alla concentrazione di creatinina nel sangue, alla concentrazione di fosfatasi alcalina nel sangue, alla concentrazione di alanina aminotransferasi nel sangue o alla concentrazione di aspartato aminotransferasi nel sangue. I dati ottenuti da questo studio hanno dimostrato che non sono stati osservati cambiamenti clinicamente significativi in nessuno degli indicatori di sicurezza descritti sopra, confermando ancora una volta la sicurezza di base per la terapia con il peptide di variante di CNP per l'acondroplasia e i sintomi associati.

In base ai dati clinici di esseri umani descritti sopra, le dosi giornaliere somministrate per via sottocutanea di 30 µg/kg/giorno e 60 µg/kg/giorno di Pro-Gly-CNP-37 a pazienti umani affetti da acondroplasia saranno testate anche relativamente all'efficacia e alla sicurezza come descritto sopra. In base ai dati divulgati nella presente, è del tutto prevedibile che tali regimi di somministrazione si rivelino sia efficaci che sicuri per il trattamento dell'acondroplasia in pazienti umani.

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.

<120> USE OF C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE VARIANTS TO TREAT SKELETAL DYSPLASIA

<130> 955-12 PCTEP

<150> US-62/199,081
 <151> 2015-07-30

<150> US-62/320,704
 <151> 2016-04-11

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Ser Gly Leu Gly Cys
 35

<210> 2
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
 35

<210> 3
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 4
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

Asn Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
35

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

RIVENDICAZIONI

1. Formulazione comprendente:

- (a) un peptide di variante di CNP selezionato dal gruppo costituito da

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N);

ID SEQ N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37;

ID SEQ N:2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37;

ID SEQ N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP 37

(M32N); ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-

CNP-37; ID SEQ N:5);

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-

CNP-37; ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Gly-CNP-37 o

CNP-38: ID SEQ N:7); e

- (b) acido citrico monoidrato, sodio citrato diidrato, trealosio diidrato, D-mannitolo, L-metionina e polisorbato 80.

2. Formulazione secondo la rivendicazione 1, la quale è liofilizzata.

3. Formulazione secondo la rivendicazione 1, la quale è in forma liquida o è ricostituita a partire da una formulazione

liofilizzata.

4. Formulazione secondo la rivendicazione 1, la quale comprende

- (a) almeno circa 2,0 mg/ml di detta variante di peptide CNP; o
- (b) almeno circa 10,0 mg/ml di detta variante di peptide CNP; o
- (c) 10,0 mg/ml di detta variante di peptide CNP.

5. Formulazione secondo la rivendicazione 1, in cui detto acido citrico monoidrato è presente a una concentrazione da circa 0,15 mg/ml a circa 0,40 mg/ml, detto sodio citrato diidrato è presente a una concentrazione da circa 0,5 mg/ml a circa 1,5 mg/ml, detto trealosio diidrato è presente a una concentrazione da circa 30 mg/ml a circa 70 mg/ml, detto D-mannitolo è presente a una concentrazione da circa 10 mg/ml a circa 20 mg/ml, detta L-metionina è presente a una concentrazione da circa 0,5 mg/ml a circa 1,5 mg/ml e detto polisorbato 80 è presente a una concentrazione da circa 0,01 mg/ml a circa 0,1 mg/ml.

6. Formulazione secondo la rivendicazione 1, in cui detto acido citrico monoidrato è presente a una concentrazione di circa 0,28 mg/ml, detto sodio citrato diidrato è presente a una concentrazione di circa 1,08 mg/ml, detto trealosio diidrato è presente a una concentrazione di circa 58,01 mg/ml, detto D-mannitolo è presente a una concentrazione di circa 15 mg/ml,

detta L-metionina è presente a una concentrazione di circa 0,73 mg/ml e detto polisorbato 80 è presente a una concentrazione di circa 0,05 mg/ml.

7. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, la quale

- (a) è priva di conservanti; e/o
- (b) è contenuta in una fiala di vetro borosilicato; e/o
- (c) ha un pH compreso tra circa 5,0 e circa 6,0, preferibilmente un pH di circa 5,5.

8. Composizione per l'uso nel trattamento della displasia scheletrica in un soggetto comprendente la fase di somministrare a detto soggetto una composizione comprendente un peptide di variante di CNP, acido citrico monoidrato, sodio citrato diidrato, trealosio diidrato, D-mannitolo, L-metionina e polisorbato 80, in cui il peptide di variante di CNP è somministrato in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui il peptide di variante di CNP è selezionato dal gruppo costituito da:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N); ID SEQ N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37; ID SEQ N:2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; ID SEQ N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP 37 (M32N);

ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37;

ID SEQ N:5);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Met-Gly-CNP-37;

ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (Gly-CNP-37 o CNP-

38: ID SEQ N:7), e in cui la fase di somministrazione tratta detta displasia scheletrica.

9. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 8, in cui il trattamento della displasia scheletrica comporta un miglioramento di uno o più sintomi della displasia scheletrica selezionati dal gruppo costituito da aumento della crescita assoluta, aumento della velocità di crescita, aumento della densità minerale ossea (BMD) mediante QCT, miglioramento della morfologia della piastra di crescita, aumento della crescita delle ossa lunghe, miglioramento della morfologia della colonna vertebrale, miglioramento del range di movimento dell'articolazione del gomito e diminuzione dell'apnea del sonno,

in cui preferibilmente la displasia scheletrica è selezionata dal gruppo costituito da acondroplasia, ipocondroplasia, bassa statura, nanismo, osteocondrodisplasie, displasia tanatofora, osteogenesi imperfetta, acondrogenesi, condrodisplasia punctata, acondroplasia omozigote, condrodisplasia punctata,

displasia camptomelica, ipofosfatasia letale congenita, osteogenesi imperfetta tipo letale perinatale, sindromi costa corta-polidattilia, ipocondroplasia, condrodisplasia punctata tipo rizomelico, displasia metafisaria tipo Jansen, displasia spondiloepifisaria congenita, atelosteogenesi, displasia diastrofica, femore corto congenito, displasia mesomelica tipo Langer, displasia mesomelica tipo Nievergelt, sindrome di Robinow, sindrome di Reinhardt, acrodisostosi, disostosi periferica, displasia di Kniest, fibrocondrogenesi, sindrome di Roberts, displasia acromesomelica, micromelia, sindrome di Morquio, sindrome di Kniest, displasia metatrofica e displasia spondiloepimetafisaria.

10. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 8 o la rivendicazione 9, in cui
 - (a) detta composizione è somministrata una volta al giorno, in cui preferibilmente detta composizione è somministrata una volta al giorno per un periodo di almeno 6 mesi; e/o
 - (b) detta composizione è somministrata per via sottocutanea.
11. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8-10, in cui
 - (a) detta composizione comprende la formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui

preferibilmente detta composizione comprende la formulazione secondo la rivendicazione 5 o la rivendicazione 6; o

(b) detta composizione comprendente detto peptide di variante di CNP è somministrata a detto soggetto, in cui è somministrata una quantità di detto peptide di variante di CNP di almeno 15 µg/kg al giorno o una quantità di almeno circa 30 µg/kg al giorno, o una quantità di almeno circa 60 µg/kg al giorno.

12. Composizione per l'uso nell'aumento della crescita delle ossa lunghe in un soggetto comprendente la fase di somministrare a detto soggetto una composizione comprendente un peptide di variante di CNP, acido citrico monoidrato, sodio citrato diidrato, trealosio diidrato, D-mannitolo, L-metionina e polisorbato 80, in cui il peptide di variante di CNP è somministrato in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui il peptide di variante di CNP è selezionato dal gruppo costituito da:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N); ID SEQ N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37; ID SEQ N.2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; ID SEQ N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP 37 (M32N);

ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37;

ID SEQ N:5);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37;

ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIIGSMSGLGC (Gly-CNP-37 o CNP-

38: ID SEQ N:7), e in cui detta fase di somministrazione aumenta la crescita delle ossa lunghe in detto soggetto.

13. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui

(a) detto soggetto presenta un'acondroplasia; o

(b) detta composizione è somministrata una volta al giorno, in cui preferibilmente detta composizione è somministrata una volta al giorno per un periodo di almeno 6 mesi; preferibilmente in cui la composizione è somministrata per via sottocutanea.

14. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 12 o la rivendicazione 13, in cui

(a) detta composizione comprende la formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui preferibilmente detta composizione comprende la formulazione secondo la rivendicazione 5 o la rivendicazione 6; o

(b) detta composizione comprendente detto peptide di

variante di CNP è somministrata a detto soggetto, in cui è somministrata una quantità di detto peptide di variante di CNP di almeno circa 15 µg/kg al giorno, o una quantità di almeno circa 30 µg/kg al giorno, o una quantità di almeno circa 60 µg/kg al giorno.

15. Composizione per l'uso nell'aumento della velocità di crescita in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente la fase di somministrare una composizione comprendente un peptide di variante di CNP, acido citrico monoidrato, sodio citrato diidrato, trealosio diidrato, D-mannitolo, L-metionina e polisorbato 80, in cui il peptide di variante di CNP è somministrato in una quantità di almeno 7,5 µg/kg, in cui detto peptide di variante di CNP è selezionato dal gruppo costituito da:

QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [CNP-37 (M32N); ID SEQ N:1];

MQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-CNP-37; ID SEQ N:2);

PQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-CNP-37; ID SEQ N:3);

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSNSGLGC [Gly-CNP 37 (M32N); ID SEQ N:4];

PGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Pro-Gly-CNP-37; ID SEQ N:5);

MGQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC (Met-Gly-CNP-37;

ID SEQ N:6); e

GQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRIQSMSGGLGC (Gly-CNP-37 o CNP-38: ID SEQ N:7), e in cui la fase di somministrazione aumenta la velocità di crescita in detto soggetto.

16. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 15, in cui

- (a) detto soggetto presenta un'acondroplasia; o
- (b) l'aumento della velocità di crescita è un aumento della velocità di crescita annualizzata, misurata come altezza in piedi, di almeno il 25% o almeno il 40% al di sopra del valore basale in detto soggetto; e/o

in cui l'aumento della velocità di crescita è valutato misurando l'altezza in piedi, l'altezza da seduto, il peso, la circonferenza della testa, la lunghezza della parte superiore del braccio, la lunghezza della parte inferiore del braccio, la lunghezza della parte superiore della gamba, la lunghezza della parte inferiore della gamba, la lunghezza delle mani o la lunghezza dei piedi.

17. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 15 o la rivendicazione 16, in cui

- (a) detta composizione è somministrata una volta al giorno, in cui preferibilmente
 - (i) detta composizione è somministrata una volta

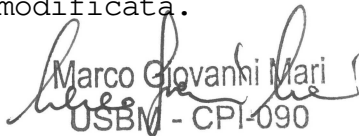
- al giorno per un periodo di almeno 6 mesi; e/o
- (ii) detta composizione è somministrata una volta al giorno per un periodo di almeno 12 mesi;
- (b) la composizione è somministrata per via sottocutanea; e/o
- (c) l'uso comprende la fase di somministrare detta composizione comprendente detto peptide di variante di CNP a detto soggetto, in cui è somministrata una quantità di detto peptide di variante di CNP di almeno circa 15 µg/kg al giorno; o di almeno circa 30 µg/kg al giorno; o di almeno circa 60 µg/kg al giorno di detto peptide di variante di CNP
18. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15-17, in cui
- (a) detta composizione comprende la formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui preferibilmente detta composizione comprende la formulazione secondo la rivendicazione 2 o la rivendicazione 6; o
- (b) l'uso non causa un evento avverso di grado due o superiore.
19. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15-18, in cui
- (a) detta composizione è somministrata per via parenterale; o

- (b) detta composizione è somministrata giornalmente, 3 volte alla settimana, due volte alla settimana, una volta alla settimana o una volta ogni due settimane; o
- (c) l'uso non comporta una variazione clinicamente significativa della concentrazione di emoglobina nel sangue, del numero di piastrine nel sangue, della concentrazione di elettroliti nel sangue, della concentrazione di azoto ureico nel sangue, della concentrazione di creatinina nel sangue, della concentrazione di fosfatasi alcalina nel sangue, della concentrazione di alanina aminotransferasi nel sangue o della concentrazione di aspartato aminotransferasi nel sangue in detto soggetto; o
- (d) l'uso comporta una variazione del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del corpo e la lunghezza della parte inferiore del corpo compresa tra -0,05 e 0,05; o
- (e) l'uso comporta una variazione del rapporto tra la lunghezza della parte superiore del braccio e la lunghezza dell'avambraccio compresa tra -0,05 e 0,05; o
- (f) l'uso comporta una variazione del rapporto tra la lunghezza della parte superiore della gamba e la lunghezza della parte inferiore della gamba compresa

tra -0,05 e 0,05.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.
Si nota che, nelle tabelle presenti nella traduzione, la notazione anglosassone dei numeri con decimali non è stata modificata.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090