

COMPUESTOS DE CNP

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a nuevos compuestos del péptido natriurético tipo C (CNP), composiciones
5 farmacéuticas que comprenden estos compuestos, y estos compuestos para su uso como medicamentos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los péptidos natriuréticos son una familia de tres hormonas relacionadas estructuralmente que
10 desempeñan funciones distintivas dentro del sistema cardiovascular. El péptido natriurético auricular (ANP) y el péptido natriurético cerebral (BNP) se expresan en el corazón y se liberan en respuesta a un estiramiento inducido por el volumen de las aurículas y los ventrículos, respectivamente. Sus efectos fisiológicos incluyen la regulación de la estructura cardíaca, la presión arterial y el volumen sanguíneo.

15 El péptido natriurético tipo C (CNP) se expresa altamente en las células endoteliales, donde se libera constitutivamente. Otras células dentro del sistema cardiovascular, lo que incluye los cardiomiocitos y los fibroblastos, también producen CNP, aunque en menor medida. El CNP tiene efectos directos sobre la inflamación, la fibrosis, la contractilidad cardíaca, la función endotelial, la angiogénesis y la presión arterial.

20 Existen tres receptores conocidos para los péptidos natriuréticos. El receptor del péptido natriurético-1 (NPR1) es una guanililciclase de partículas que cataliza la síntesis de GMPc tras la unión por ANP o BNP. NPR1 se expresa en riñón, pulmón, tejido adiposo, adrenales, cerebro, corazón, testículos y tejido muscular liso vascular. NPR2, que se expresa en hueso, cerebro, fibroblastos, corazón, riñón, hígado, pulmón, útero y tejido muscular liso vascular, es homólogo a NPR1, pero es activado
25 selectivamente por el CNP. Por el contrario, NPR3 contiene solo un dominio intracelular de 37 residuos y carece de actividad guanililciclase. Controla las concentraciones locales de los péptidos natriuréticos mediante internalización y degradación mediadas por el receptor, pero hay pruebas acumuladas de una función de señalización de NPR3. Los tres péptidos natriuréticos se unen a NPR3 con alta afinidad y este receptor es el que se expresa más amplia y abundantemente de los tres
30 receptores. También existe un grado muy alto de conservación de los tres receptores y, en línea con el CNP, NPR2 es el más altamente conservado.

Los datos clínicos y preclínicos han demostrado un papel esencial del CNP y sus dos receptores para la función cardio-renal-metabólica, y también existen datos acumulados que respaldan que el direccionamiento a este sistema guarda potencial terapéutico en una amplia gama de enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas (Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 2281; Cardiovasc. Res. 2022, 118, 2085–2102; Cardiovasc. Res. 25 de agosto de 2022; cvac125)”. De manera similar, la genética humana, así como también los datos preclínicos y clínicos, respaldan NPR2 y CNP como reguladores del crecimiento óseo, con potencial terapéutico en una amplia gama de indicaciones de baja estatura que se relacionan con NPR2 y CNP (Lancet, 396:684; J Pharmacol Exp Ther, 370:459; Hisado-Oliva (2018) Genet Med, 20:91, así como también con la displasia esquelética relacionada con FGFR3 (Sabir y Cole Orphanet Journal of Rare Diseases (2019) 14:300; Krakow y Rimoin, Genetics in Medicine (2010) 12:6, Decker y otros. Human Molecular Genetics (2011), 20:8) y RASopatías (Adv Cancer Res. 153:305). Actualmente, dos compuestos de CNP están en desarrollo clínico para la acondroplasia, que es un tipo de enanismo (CNP BMN111(Vosoritida) y TransCon). La clínica Mayo ha explorado previamente un compuesto de CNP diseñado para activar tanto NPR2 como NPR1 en la insuficiencia cardíaca (J Am Coll Cardiol. 1 de julio de 2008; 52(1): 60–68).

El aclaramiento del CNP en el plasma humano es muy rápido, con una semivida calculada de minutos. Dada esta corta semivida, sería beneficioso desarrollar nuevos compuestos de CNP de acción prolongada que puedan administrarse con menos frecuencia, al tiempo que retienen un perfil clínico aceptable.

Se ha usado una gama de diferentes enfoques para modificar la estructura del CNP para proporcionar un perfil de acción más prolongado. El documento WO 2013/058833 describe péptidos de fusión de CNP y dominios Fc. El documento WO 2018/175534 describe agonistas del NPR1 modificados con ácidos grasos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención proporciona compuestos de CNP con propiedades farmacocinéticas mejoradas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador, en donde la carga neta del compuesto a pH fisiológico es 0 o negativa, en donde el péptido CNP comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula I:

AA₀₁- AA₀₂-AA₀₃-AA₀₄-AA₀₅-AA₀₆-AA₀₇-AA₀₈-AA₀₉-AA₁₀-AA₁₁-AA₁₂-AA₁₃-AA₁₄-AA₁₅-AA₁₆-
AA₁₇-AA₁₈-AA₁₉-AA₂₀-AA₂₁-AA₂₂-AA₂₃-AA₂₄-AA₂₅-AA₂₆-AA₂₇-AA₂₈-AA₂₉-AA₃₀-AA₃₁-AA₃₂-
AA₃₃-AA₃₄-AA₃₅-AA₃₆-AA₃₇

en donde

AA₀₁ es Gln o está ausente,

AA₀₂ es Glu o está ausente,

AA₀₃ es His o está ausente,

5 AA₀₄ es Pro o está ausente,

AA₀₅ es Asn o Gln o Glu o está ausente,

AA₀₆ es Ala o está ausente,

AA₀₇ es Arg o His o Ala o está ausente,

AA₀₈ es Lys o Ser o His o está ausente,

10 AA₀₉ es Tyr o Glu o está ausente

AA₁₀ es Lys o Glu o Gln o His o está ausente,

AA₁₁ es Gly,

AA₁₂ es Ala,

AA₁₃ es Gln o Asn o Glu,

15 AA₁₄ es Lys o His o Glu,

AA₁₅ es Lys Ser o Glu o Thr o His,

AA₁₆ es Gly,

AA₁₇ es Leu o Gly o Ser o Val,

AA₁₈ es Ser o His

20 AA₁₉ es Gln o Ser o Lys o His,

AA₂₀ es Gly,

AA₂₁ es Cys,

AA₂₂ es Phe,

AA₂₃ es Gly,

25 AA₂₄ es Leu,

AA₂₅ es Pro o Lys,

AA₂₆ es Leu,

AA₂₇ es Asp o Glu,

AA₂₈ es Arg,

30 AA₂₉ es Ile,

AA₃₀ es Gly,

AA₃₁ es Ser,

AA₃₂ es Leu o Nle o Met,

AA₃₃ es Ser,

AA₃₄ es Gly,

AA₃₅ es Leu,

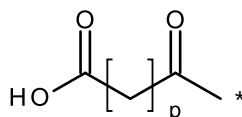
5 AA₃₆ es Gly y

AA₃₇ es Cys;

en donde el grupo modificador comprende el Quím. A, el Quím. B y el Quím. C;

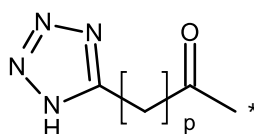
en donde el Quím. A se selecciona del grupo que consiste en:

10



(Quím. A1) y

15



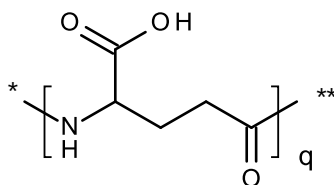
(Quím. A2),

en donde p es un número entero en el intervalo de 14-20, y

donde * denota un enlace amida que conecta el Quím. A y el Quím. B; y

en donde el Quím. B se selecciona del grupo que consiste en:

20

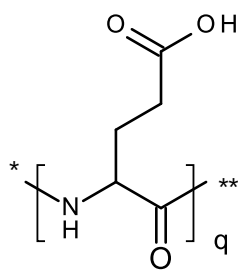


(Quím. B1)

25

y

30

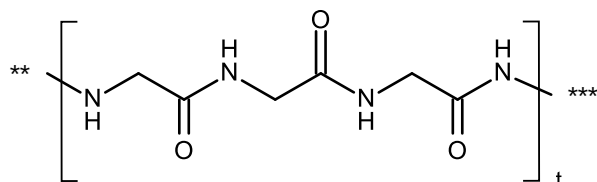
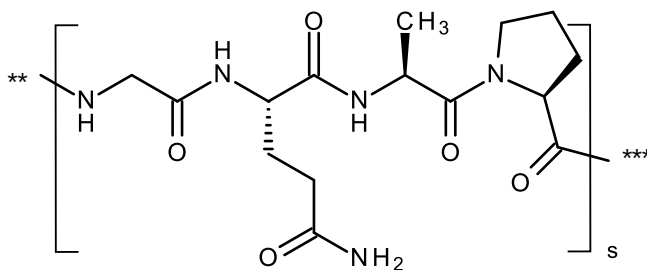


(Quím. B2)

en donde el Quím. C se selecciona del grupo que consiste en:

$$^{**} \left[\text{NH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \right]_r ^{***}$$

10



25 en donde *** denota un enlace amida que conecta el Quím. alfa-amino C- y N-terminal en el péptido
CNP.

30

YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 103),

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 67) y

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC (SEQ ID NO: 104).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 La presente invención también proporciona en un aspecto, el uso de los compuestos de la invención como medicamentos para tratar o prevenir enfermedades cardio-renales-metabólicas, lo que incluye insuficiencia cardíaca y acondroplasia.

- La corta semivida de aproximadamente dos minutos del CNP *wt* hace que el CNP no sea adecuado para el uso farmacéutico. En la presente invención, la semivida del CNP se extiende mediante la
- 10 acilación con ácidos grasos que facilita de unión a la albúmina. Sin embargo, la combinación del péptido CNP con carga neta positiva (a pH fisiológico) con una modificación del aglutinante de albúmina de ácido graso (donde el compuesto de CNP tiene carga general positiva) conduce a reacciones significativas en el sitio de inyección tras la inyección subcutánea, así como también a una baja biodisponibilidad. Esto es sorprendente ya que un péptido CNP con carga neta positiva sin
- 15 un aglutinante de albúmina de ácido graso unido no muestra reacciones observables en el sitio de inyección. Para resolver estos problemas, se han introducido sustituciones de aminoácidos en el péptido CNP y se han introducido cargas negativas en el grupo modificador (que comprende el ácido graso). La combinación de estas modificaciones da como resultado un compuesto de carga negativa neta general a pH fisiológico que muestra una buena biodisponibilidad subcutánea y reacciones en
- 20 el sitio de inyección subcutánea de nulas a leves.

- Sorprendentemente, la adición de cargas negativas también reduce la potencia *in vitro* e *in vivo* de los compuestos de CNP, de manera que la carga neta negativa más alta generalmente se correlaciona con una potencia *in vivo* más baja. Para retener suficiente potencia de los compuestos de CNP, se introduce solamente un número bajo de cargas netas negativas. Sin embargo, un número bajo de
- 25 cargas netas negativas reduce la solubilidad y la estabilidad biofísica de los compuestos de CNP cuando se formulan para la administración subcutánea a un pH fisiológicamente relevante. La presente descripción alcanza un equilibrio con respecto a estos parámetros y, sorprendentemente, proporciona compuestos de CNP con suficiente potencia, y también suficiente solubilidad y estabilidad biofísica para la formulación líquida.

- 30 Además, el CNP *wt* no muestra la estabilidad deseada en la formulación líquida necesaria para una administración farmacéutica conveniente. En la presente invención, se introducen sustituciones de

aminoácidos seleccionadas de la secuencia de CNP *wt* para facilitar la estabilidad química en la formulación.

La presente descripción proporciona compuestos de CNP con semivida prolongada y buena tolerabilidad para la administración subcutánea mientras retiene suficiente potencia *in vivo* para el uso terapéutico y alta estabilidad química y biofísica en la formulación líquida.

La invención también puede resolver problemas adicionales que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La Figura 1 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 0776 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 2 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 0312 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

15 La Figura 3 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1225 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 4 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1233 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 5 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1227 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

20 La Figura 6 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1241 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 7 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1351 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

25 La Figura 8 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1354 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 9 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1356 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 10 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1375 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

30 La Figura 11 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1376 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 12 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1377 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 13 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1352 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

5 La Figura 14 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1379 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 15 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1434 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

10 La Figura 16 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9384 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 17 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9407 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 18 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1420 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

15 La Figura 19 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1378 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 20 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1381 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

20 La Figura 21 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1386 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 22 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1389 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 23 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1392 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

25 La Figura 24 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1426 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 25 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9435 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

30 La Figura 26 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 1235 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 27 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9482 a ratas como se describe en el ejemplo 11.

La Figura 28 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 0312 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 29 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 0776 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

5 La Figura 30 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9384 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 31 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9407 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

10 La Figura 32 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9435 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 33 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9480 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 34 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9482 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

15 La Figura 35 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración i.v. del compuesto ID 9483 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 36 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 0312 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

20 La Figura 37 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 0776 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 38 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9384 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 39 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9407 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

25 La Figura 40 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9435 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 41 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9480 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

30 La Figura 42 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9482 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 43 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPC) después de la administración s.c. del compuesto ID 9483 a minicerdos Göttingen como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 44 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 0312 a cerdos LYD domésticos como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 45 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 0776 a cerdos LYD domésticos como se describe en el ejemplo 12.

5 La Figura 46 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1225 a cerdos LYD domésticos como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 47 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del compuesto ID 1227 a cerdos LYD domésticos como se describe en el ejemplo 12.

La Figura 48 muestra la respuesta farmacodinámica (GMPc) después de la administración i.v. del
10 compuesto ID 1235 a cerdos LYD domésticos como se describe en el ejemplo 12.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona compuestos de CNP con propiedades farmacocinéticas mejoradas. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas y el uso de los
15 compuestos y composiciones de la presente invención como medicamentos para tratar enfermedades.

Péptido natriurético tipo C

El péptido natriurético tipo C (CNP) (núm. de acceso de GenBank NP 077720) es un péptido pequeño monocatenario en una familia de péptidos (ANP, BNP, CNP) que tiene una estructura de anillo disulfuro de residuo de 17 aminoácidos y tiene funciones importantes en múltiples procesos
20 biológicos. El CNP interactúa con el receptor del péptido natriurético 2 (NPR2, NPR-B, GC-B) para estimular la generación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). El CNP se expresa más ampliamente, lo que incluye en el sistema nervioso central, el tracto reproductivo, los huesos y el endotelio de los vasos sanguíneos. El aclaramiento del CNP en plasma humano es rápido, con una semivida de minutos.

25 El gen y el polipéptido de CNP natural se han descrito previamente. La patente de Estados Unidos núm. 5,352,770 describe el CNP-22 aislado y purificado de cerebro porcino idéntico en secuencia al CNP humano (CNP-22 de tipo salvaje humano: GLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (SEQ ID NO: 01)). La patente de Estados Unidos núm. 6,034,231 describe el gen y el polipéptido de pre-pro-CNP humano (126 aminoácidos) y el gen y el péptido de CNP-53 humano. El CNP-37 de tipo salvaje
30 humano tiene la secuencia QEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GMSGLGC (SEQ ID NO: 02).

Compuesto de CNP

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador, en donde la carga neta del compuesto a pH fisiológico es 0 o negativa. Los compuestos de CNP como se describen en la presente descripción, se han modificado por ingeniería genética para lograr un compuesto de carga negativa neta o neutra general. Esto se logró con la introducción de sustituciones de aminoácidos del péptido CNP, y con la introducción de cargas negativas en el grupo modificador. No es trivial reducir la carga del compuesto de CNP y aun así retener la actividad biológica del compuesto de CNP hacia el receptor NPR2.

El término “carga neta”, como se usa en la presente, se refiere a la suma de todas las cargas negativas y positivas en el compuesto de CNP a un pH dado, donde las cargas se definen únicamente por la constante de disociación de ácido de cada grupo ionizable en el compuesto de CNP.

En una modalidad, la carga neta del compuesto de CNP a pH fisiológico es negativa determinada como se describe en el ejemplo 4.

En una modalidad, la carga neta del compuesto de CNP a pH fisiológico es de 0 a -4, determinada como se describe en el ejemplo 4.

El término "pH fisiológico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un pH en el intervalo de 7.35 a 7.45 incluidos, más típicamente 7.4 en promedio.

En un aspecto, los compuestos de CNP, descritos en la presente descripción, tienen un puente disulfuro intramolecular (enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína), lo que da como resultado una estructura cíclica.

Péptido CNP

El término “péptido CNP”, como se usa en la presente, se refiere a un péptido que tiene de 37 a 22 aminoácidos de largo que comprende la secuencia de aminoácidos de CNP-22 (SEQ ID NO: 01) y las secuencias de aminoácidos de este que incluyen una o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos). El término “péptido CNP”, como se usa en la presente, abarca además variantes del CNP.

El término “variante del CNP”, como se usa en la presente, se refiere a un péptido CNP, que es una variante de aminoácido de la secuencia del CNP-37 (SEQ ID NO: 02). En otras palabras, una variante del CNP es un péptido CNP que incluye una o más modificaciones de aminoácidos, es decir, en el que al menos se ha cambiado un aminoácido en comparación con la SEQ ID NO: 02. Estas modificaciones pueden representar, independientemente, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

Una variante del CNP puede describirse con referencia al número del residuo de aminoácido que se cambia (es decir, la posición correspondiente en la secuencia del CNP-37 (SEQ ID NO:02)) y el cambio (por ejemplo, la identidad del residuo de aminoácido en la variante en la posición dada). Es decir, las referencias numéricas a residuos de aminoácidos específicos del péptido CNP, si no se indica de cualquier otra manera, se refieren a la secuencia del CNP-37 (SEQ ID NO: 2) (es decir, el residuo 1 es glutamina (Q1), y el residuo 37 es cisteína (C37)). El siguiente es un ejemplo no limitante de la nomenclatura de una variante adecuada: la variante del CNP des1-4, 5Q, 13Q, 32Nle designa una secuencia del péptido CNP que, en comparación con CNP-37, tiene los siguientes cambios de aminoácidos: delección de los residuos de aminoácidos en las posiciones 1–4, así como también sustituciones de asparagina (N) en la posición 5 con glutamina (Q), de asparagina (N) en la posición 13 con glutamina (Q), de metionina (M) en la posición 32 con norleucina.

El término "aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido de origen natural (lo que incluye los 20 aminoácidos estándar que están codificados por el código genético estándar en los seres humanos) o que no es de origen natural. Los residuos de aminoácidos pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras, como es usual en la técnica. Estas tres maneras son completamente equivalentes. El término "aminoácidos no codificados" se refiere a todos los aminoácidos que no están entre los 20 aminoácidos estándar codificados por el código genético estándar en los seres humanos. Los aminoácidos no codificados pueden existir en la naturaleza o ser puramente sintéticos. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no codificados son los isómeros D de los aminoácidos codificados, y residuos de glicina con una cadena lateral unida al átomo de nitrógeno en lugar de al átomo de carbono alfa. Los isómeros D de los aminoácidos codificados pueden denominarse como (i) "D- "seguido del nombre completo, seguido del código de una letra, o seguido del código de tres letras del aminoácido, o como (ii) el código de una letra en minúscula del aminoácido. Más abajo se presentan abreviaturas adicionales para los aminoácidos no codificados usadas en esta solicitud.

Abreviaturas

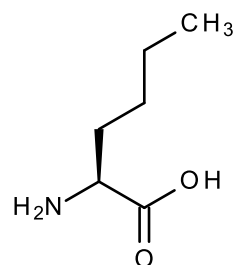
Nombre del residuo

Estructura química

5

Nle (X)

L-Norleucina



(Quím. D)

En un aspecto de la invención, el péptido CNP comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula I:

10

AA₀₁-AA₀₂-AA₀₃-AA₀₄-AA₀₅-AA₀₆-AA₀₇-AA₀₈-AA₀₉-AA₁₀-AA₁₁-AA₁₂-AA₁₃-AA₁₄-AA₁₅-AA₁₆-
AA₁₇-AA₁₈-AA₁₉-AA₂₀-AA₂₁-AA₂₂-AA₂₃-AA₂₄-AA₂₅-AA₂₆-AA₂₇-AA₂₈-AA₂₉-AA₃₀-AA₃₁-AA₃₂-
AA₃₃-AA₃₄-AA₃₅-AA₃₆-AA₃₇

en donde

15

AA₀₁ es Gln o está ausente,

AA₀₂ es Glu o está ausente,

AA₀₃ es His o está ausente,

AA₀₄ es Pro o está ausente,

AA₀₅ es Asn o Gln o Glu o está ausente,

20

AA₀₆ es Ala o está ausente,

AA₀₇ es Arg o His o Ala o está ausente,

AA₀₈ es Lys o Ser o His o está ausente,

AA₀₉ es Tyr o Glu o está ausente

AA₁₀ es Lys o Glu o Gln o His o está ausente,

25

AA₁₁ es Gly,

AA₁₂ es Ala,

AA₁₃ es Gln o Asn o Glu,

AA₁₄ es Lys o His o Glu,

AA₁₅ es Lys Ser o Glu o Thr o His,

30

AA₁₆ es Gly,

AA₁₇ es Leu o Gly o Ser o Val,

AA₁₈ es Ser o His

- AA₁₉ es Gln o Ser o Lys o His,
 AA₂₀ es Gly,
 AA₂₁ es Cys,
 AA₂₂ es Phe,
- 5 AA₂₃ es Gly,
 AA₂₄ es Leu,
 AA₂₅ es Pro o Lys,
 AA₂₆ es Leu,
 AA₂₇ es Asp o Glu,
- 10 AA₂₈ es Arg,
 AA₂₉ es Ile,
 AA₃₀ es Gly,
 AA₃₁ es Ser,
 AA₃₂ es Leu o Ile o Met,
- 15 AA₃₃ es Ser,
 AA₃₄ es Gly,
 AA₃₅ es Leu,
 AA₃₆ es Gly y
 AA₃₇ es Cys.
- 20 En ciertas modalidades de la invención, se introducen sustituciones de aminoácidos del péptido CNP para reducir las cargas positivas del péptido CNP. Por ejemplo, Lys25 (AA₂₅) se sustituye por Pro y Lys19 (AA₁₉) se sustituye por Gln o Ser para eliminar la carga positiva.
 En ciertas modalidades de la invención, AA₁₃ del péptido CNP es Gln; AA₁₉ es Gln o Ser; AA₂₅ es Pro; y AA₃₂ es Leu.
- 25 En ciertas modalidades de la invención, AA₅ del péptido CNP es Gln; AA₁₃ es Gln; AA₁₉ es Gln o Ser; AA₂₅ es Pro; y AA₃₂ es Leu.
 En ciertas modalidades de la invención, el péptido CNP tiene una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:
- GAQKKGSSQGCFLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 136),
- 30 ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 77),
 YKGAQKKGSSQGCFLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 88),
 YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 103),

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 67) y

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC (SEQ ID NO: 104).

Grupo modificador

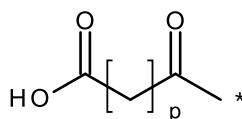
En un aspecto de la invención, el compuesto de CNP comprende un grupo modificador unido covalentemente a un residuo de aminoácido del péptido CNP.

En un aspecto de la invención, el grupo modificador es capaz de formar asociaciones no covalentes con la albúmina y de esta manera promover la circulación del compuesto de CNP en el torrente sanguíneo, lo que tiene el efecto de prolongar la exposición plasmática y extender la semivida plasmática del compuesto de CNP en comparación con la semivida plasmática de CNP-22 (SEQ ID NO: 01) y CNP-37 (SEQ ID NO: 02). El grupo modificador tiene el efecto de extender y prolongar el tiempo de acción del compuesto de CNP, por tanto, también puede denominarse como grupo prolongador.

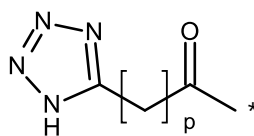
En algunas modalidades de la invención, el grupo modificador está unido covalentemente al aminoácido N-terminal del péptido CNP.

En algunas modalidades de la invención, el grupo modificador está unido covalentemente al alfa-amino N-terminal del péptido CNP.

En un aspecto de la invención, el grupo modificador comprende el Quím. A, el Quím. B y el Quím. C; en donde el Quím. A se selecciona del grupo que consiste en:



(Quím. A1) y

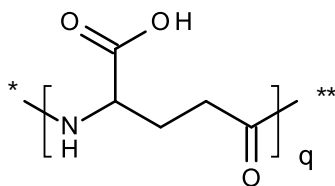


(Quím. A2)

en donde p es un número entero en el intervalo de 14-20, y

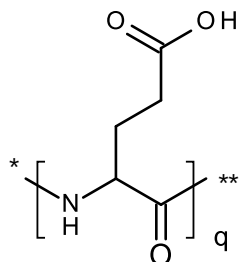
donde * denota un enlace amida que conecta el Quím. A y el Quím. B; y

en donde el Quím. B se selecciona del grupo que consiste en:



5 (Quím. B1)

y



10

(Quím. B2)

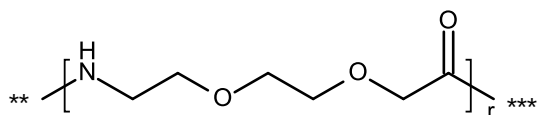
en donde q es un número entero en el intervalo de 1-8,

15

en donde * denota un enlace amida que conecta el Quím. A- y el Quím. B-,

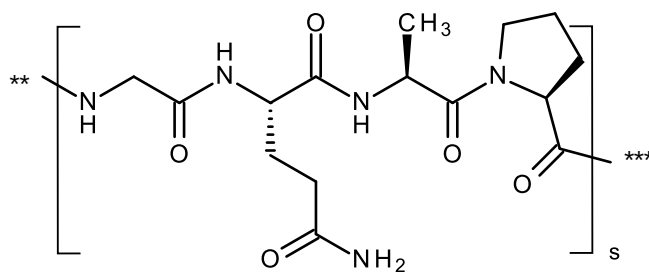
en donde ** denota un enlace amida que conecta el Quím. B- y el Quím. C-; y

en donde el Quím. C se selecciona del grupo que consiste en:



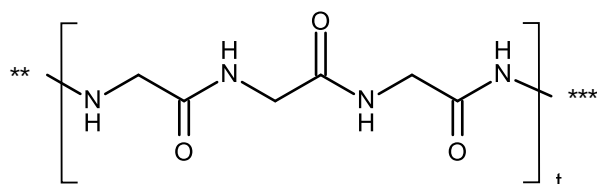
20

(Quím. C1),



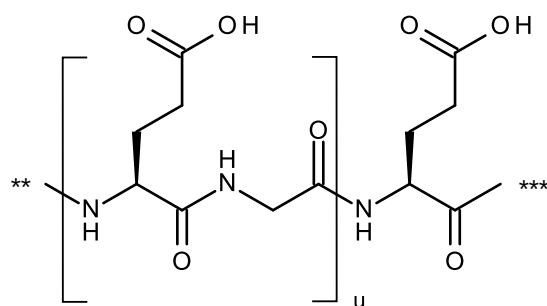
25

(Quím. C2) y



30

(Quím. C3)



(Quím C4),

en donde r es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde s es un número entero en el intervalo de 0-3,

en donde t es un número entero en el intervalo de 0-1,

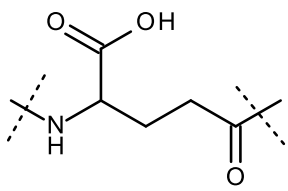
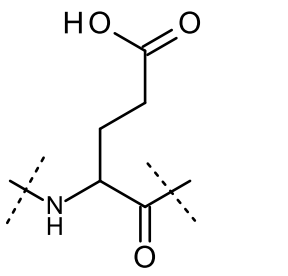
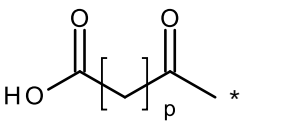
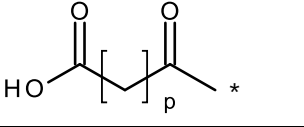
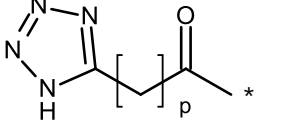
en donde u es un número entero en el intervalo de 0-3,

en donde ** denota un enlace amida que conecta el Quím. B- y el Quím. C-,

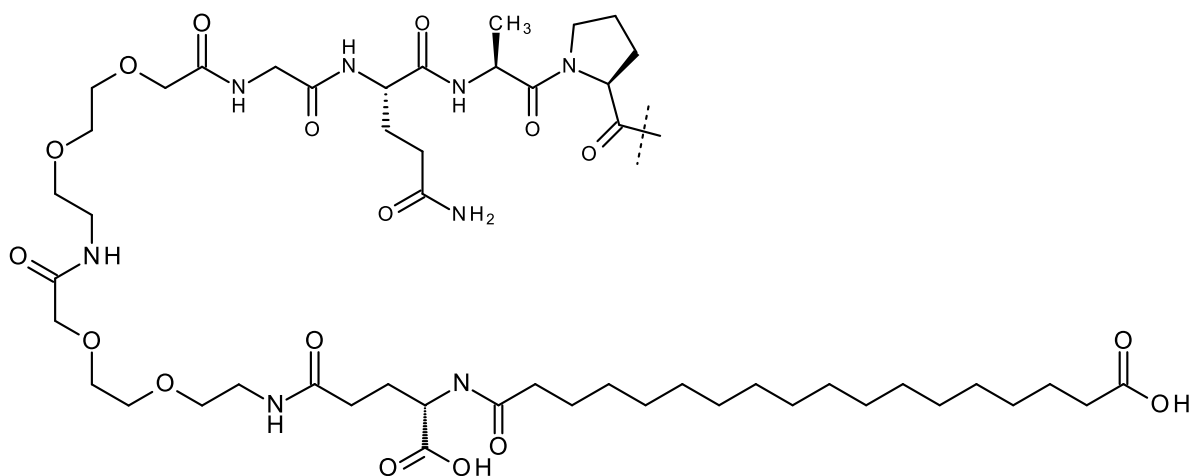
en donde *** denota un enlace amida que conecta el Quím. alfa-amino C- y N-terminal en el péptido CNP.

Más abajo se presentan las abreviaturas para los elementos de los grupos modificadores usados en esta solicitud:

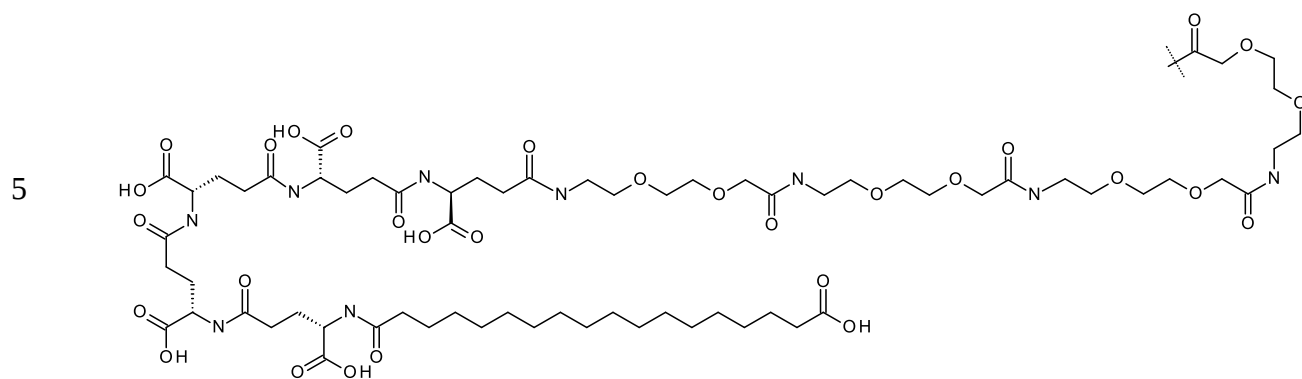
Abreviaturas	Quím. Núm	Estructura química
OEG	Quím. C1	
GQAP	Quím. C2	
GGG	Quím. C3	

Abreviaturas	Quím. Núm	Estructura química
gGlu,	Quím. B1	
Glu	Quím. B2	
C18d	Quím. A1, donde p es igual a 16	
C20d	Quím. A1, donde p es igual a 18	
Tetrazol-C18	Quím. A2, donde p es igual a 16	

En algunas modalidades de la invención, el grupo modificador se selecciona de los siguientes ejemplos no limitantes: Quím. E, Quím. F, Quím. G, Quím. H, Quím. I y Quím. J (en los que la línea de puntos define la unión a través de un enlace amida al péptido CNP).

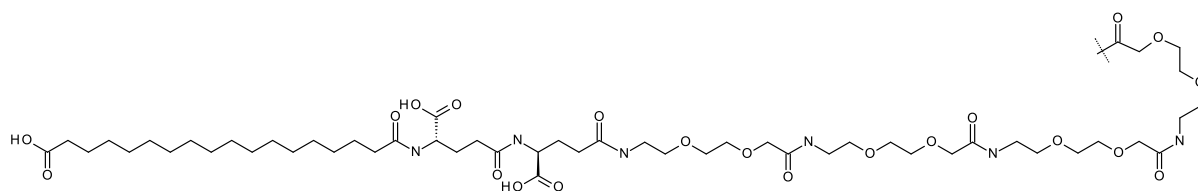


(Quím. E)

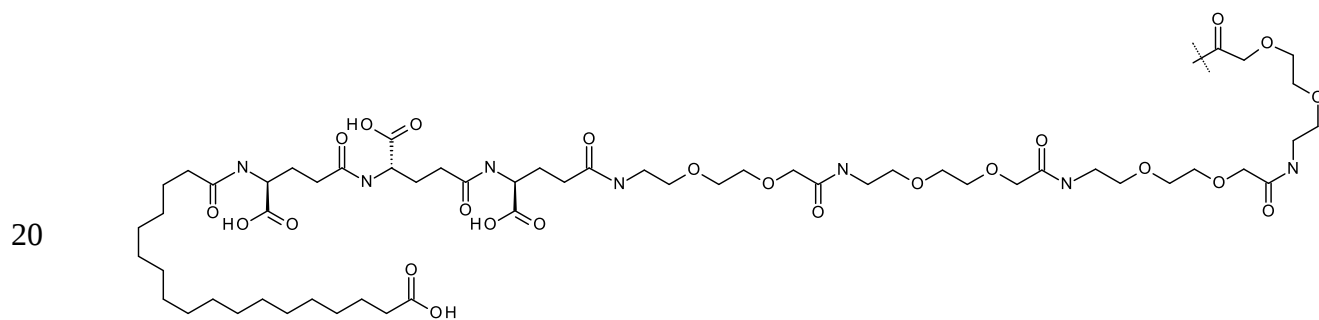


(Quím. F)

10

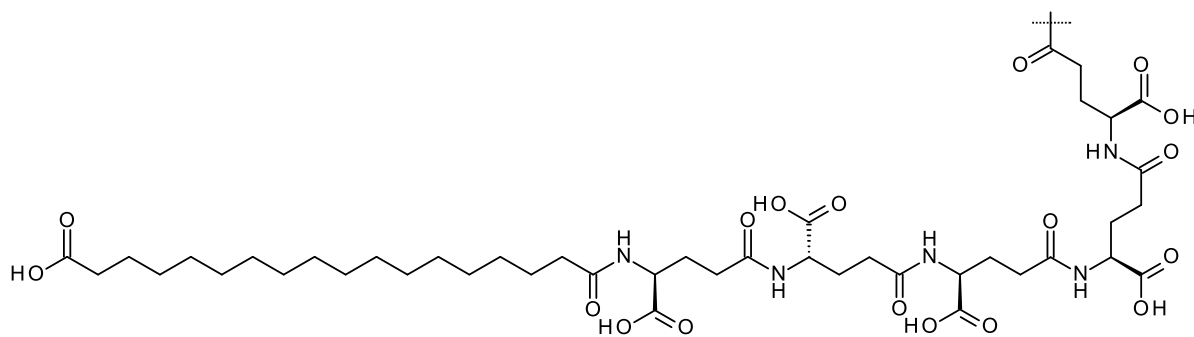


15 (Quím. G)



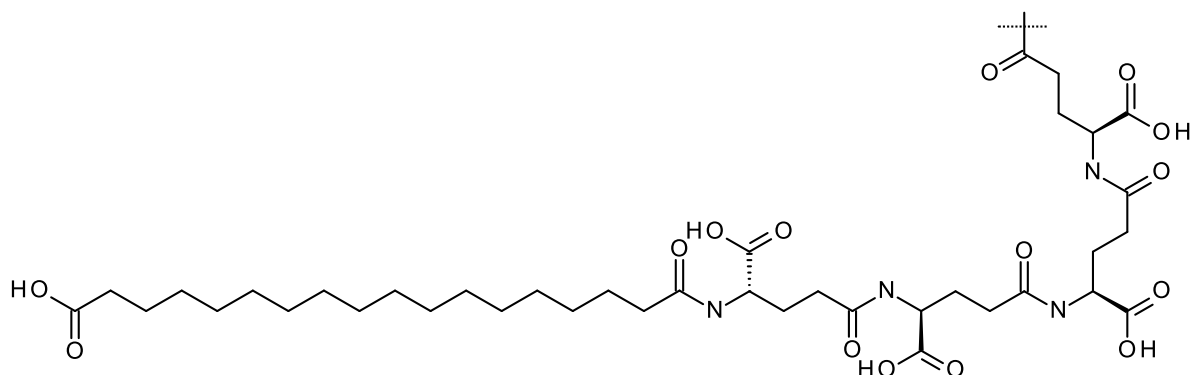
(Quím. H)

25



30

(Quím. I)



(Quím. J)

El grupo modificador de la invención puede existir en diferentes formas estereoisoméricas que tienen la misma fórmula molecular y secuencia de átomos unidos, pero que difieren solo en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. El estereoisomerismo de los grupos modificadores ejemplificados de la invención se indica en la sección experimental, en los nombres, así como también en las estructuras, mediante el uso de la nomenclatura estándar. A menos que se establezca de cualquier otra manera, la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas de los grupos modificadores reivindicados.

Propiedades funcionales

En algunos aspectos de la invención, los compuestos de CNP tienen propiedades biofísicas convenientes. Los compuestos de CNP exhiben una semivida *in vivo* extendida. También, los compuestos de CNP de la invención tienen actividad biológica. Además, los compuestos de la invención tienen una estabilidad conveniente. Además, los compuestos de la invención tienen una solubilidad conveniente. Además, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía subcutánea sin provocar un nivel de reacción tisular local no conveniente, como la necrosis.

Actividad biológica

En un aspecto de la invención, los compuestos tienen actividad biológica *in vitro*, que puede determinarse como su capacidad para activar el receptor NPR2 *in vitro* en una línea celular que expresa el receptor NPR2, que puede determinarse como su capacidad para aumentar la producción y concentración de GMPC, que representa la activación del receptor aguas abajo de NPR2, en la célula. La actividad biológica *in vitro* puede determinarse, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 2.

En un aspecto de la invención, los compuestos tienen actividad biológica *in vivo*, que puede determinarse como su capacidad para aumentar la concentración de GMPc en plasma después de la administración i.v. o s.c. ya sea en ratas o minicerdos Göttingen o cerdos LYD domésticos.

La rata es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y la actividad puede determinarse en dichas ratas *in vivo*, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 11.

Los minicerdos Göttingen o los cerdos LYD domésticos son otros ejemplos de modelos animales adecuados, y la actividad puede determinarse en tales cerdos *in vivo*, como se describe en el ejemplo 12.

Semivida plasmática

En un aspecto de la invención, los compuestos de CNP tienen una exposición plasmática prolongada y tienen una semivida plasmática *in vivo* extendida con relación al CNP nativo, que puede determinarse en un estudio farmacocinético *in vivo* adecuado. La exposición plasmática extendida puede determinarse como semivida plasmática ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. o s.c. a animales tales como ratas, minicerdos Göttingen o cerdos LYD domésticos.

En algunas modalidades de la invención, los compuestos de CNP tienen una semivida plasmática después de la administración i.v. a ratas de al menos 4 horas, con mayor preferencia, al menos 8 horas, o con la máxima preferencia, al menos 10 horas, determinada como se describe en el ejemplo 11.

En algunas modalidades de la invención, los compuestos de CNP tienen una semivida plasmática *in vivo* después de la administración i.v. o s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 10 horas, con mayor preferencia, al menos 40 horas o con la máxima preferencia al menos 60 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

Biodisponibilidad

En un aspecto de la invención, los compuestos tienen una biodisponibilidad adecuada después de la inyección subcutánea. La biodisponibilidad (F%) puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado.

Los minicerdos Göttingen o los cerdos LYD domésticos son ejemplos de modelos animales adecuados, y la biodisponibilidad puede determinarse en tales minicerdos Göttingen o cerdos LYD domésticos *in vivo*, como se describe en el ejemplo 12.

En algunas modalidades de la invención, los compuestos de CNP tienen una biodisponibilidad después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 40 %, 50 %, 60 % o 70 %.

Estabilidad

En un aspecto de la invención, los compuestos tienen una estabilidad física y química adecuada. La ausencia de estabilidad física o química podría conducir a cambios en la estructura del compuesto que conducen a la formación de productos de la degradación química que potencialmente tienen una actividad biológica reducida, una solubilidad disminuida y/o un efecto inmunogénico aumentado en comparación con el compuesto intacto.

La estabilidad física puede evaluarse midiendo la propensión a la formación de fibrillas, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo ThT como se describe en el ejemplo 6.

La estabilidad química puede evaluarse midiendo la cantidad de productos de la degradación química (como isómeros, isoAsp y productos de hidrólisis) en diversos puntos temporales después de la exposición a diferentes condiciones como temperatura elevada, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 8.

La estabilidad también podría evaluarse al observar la capacidad de las moléculas para formar dímeros y multímeros covalentes, denominados HMWP, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 7.

Solubilidad

De acuerdo con un aspecto funcional de la invención, los compuestos de CNP tienen una solubilidad conveniente. La baja solubilidad del CNP puede obstaculizar significativamente sus propiedades de formulación farmacéutica y uso terapéutico, por lo que desarrollar un compuesto de CNP con alta solubilidad en formulaciones relevantes mejoraría la utilidad terapéutica.

Como se describe en la presente descripción, la solubilidad se mide como se describe en el ejemplo 5.

En ciertas modalidades, los compuestos de CNP de la invención tienen una solubilidad de al menos 2,000 μM , 3,000 μM o 4,000 μM de solubilidad a pH 4 o pH 6.5.

Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención, y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones son adecuadas para la administración parenteral.

En una modalidad, el compuesto está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En otro aspecto, el compuesto está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml.

En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 3.0 a 8.0. En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 3.5 a 5.5. En una modalidad adicional, la formulación tiene un pH de 6.0 a 7.0. Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington's
5 Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

La formulación puede comprender además un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de isotonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y/o surfactantes. El uso de dichos excipientes en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia
10 a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. El término “formulación acuosa” se define como una formulación que comprende al menos 50 % p/p de agua.

15 Igualmente, el término “solución acuosa” se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua y el término “suspensión acuosa” se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes de su uso. En otra modalidad, la formulación
20 farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por atomización) lista para su uso sin ninguna disolución previa. Por el término “forma seca” se entiende la composición farmacéutica líquida o la formulación que se seca ya sea por secado por congelación (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por atomización (ver Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5^{ta} ed; Longman Scientific and
25 Technical, Essex, Reino Unido), pp. 491-676; Broadhead y otros (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler y otros (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

En una modalidad de la invención adicional, el(los) tampón(ones) se seleccionan del grupo que consiste en acetato, carbonato, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno
30 fosfato, hidrógeno fosfato, fosfato y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, ácido láctico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una modalidad de la invención alternativa.

En otra modalidad de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En una modalidad de la invención adicional, la formulación comprende además un agente isotónico, por ejemplo, propilenglicol, manitol o glicerol. En una modalidad de la invención adicional, la formulación comprende además un agente quelante.

- 5 En otra modalidad de la invención adicional, la formulación comprende además un estabilizante. El uso de un estabilizante en las composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, 1995.

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el péptido durante el almacenamiento de la composición.

Por “base de aminoácido” se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en
15 sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre, mientras que otros están presentes en sus formas de sal. En una modalidad, los aminoácidos usados en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o mezclas de estos) de un aminoácido en
20 particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de estos) o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido en particular esté presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En una modalidad, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también pueden formularse con derivados de
25 estos aminoácidos. Los derivados de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los derivados de metionina adecuados incluyen etionina y butionina, y los derivados de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los derivados de aminoácidos se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o en su forma de sal. En otra modalidad de la invención, los aminoácidos o derivados de
30 aminoácidos se usan en una concentración que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

En otra modalidad de la invención, la formulación comprende además un surfactante. En otra modalidad de la invención, la formulación comprende además inhibidores de proteasas. El uso de un inhibidor de proteasa es útil particularmente en composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

- 5 Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de volumen, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, 10 lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un paciente que necesita dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, en sitios de la piel y las mucosas, en sitios que no necesitan de la absorción, por ejemplo, la 15 administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican la absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede realizarse a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o sus 20 combinaciones, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, 25 cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizadores, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones que se transforman in situ, por ejemplo, gelificación in situ, colocación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión, e implantes.

30 Las composiciones de la invención pueden además combinarse, o unirse, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, con un portador farmacéutico, sistema de suministro de fármacos y sistema de suministro de fármacos avanzado para potenciar adicionalmente

la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida para los expertos en la técnica, y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquiera de sus combinaciones.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar del compuesto de CNP de la presente invención, mediante el uso de, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos ellos dispositivos bien conocidos para los expertos en la técnica.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sistemas de suministro de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta.

La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto de CNP de la presente invención en forma de un atomizador nasal o pulmonar. Como aún otra opción, las composiciones farmacéuticas que contienen el péptido de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosal, por ejemplo, bucal.

El compuesto de CNP de la presente invención puede administrarse por la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco mediante el uso de cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para el suministro pulmonar de fármacos. Los ejemplos de estos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generación de aerosoles para el suministro pulmonar de fármacos, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis medida o inhaladores de polvo seco (consultar Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

En una modalidad de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento. En otra modalidad de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de la invención es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En un aspecto, un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la invención comprende mezclar un compuesto de acuerdo con la invención con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Indicaciones médicas

- 5 La presente invención se refiere, además, a un compuesto para su uso como un medicamento.
- El término “tratamiento”, como se usa en la presente, se refiere al tratamiento médico de cualquier sujeto humano que necesite del mismo. El momento y el propósito de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con el estado de salud del sujeto. Dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo.
- 10 En un aspecto, el compuesto de la invención puede usarse para el tratamiento de enfermedades cardio-renales-metabólicas. Las enfermedades cardio-renales-metabólicas incluyen, pero no se limitan, al grupo que consiste de hipertensión, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, infarto agudo de miocardio, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca congestiva, edema cardíaco, edema renal, edema hepático*, insuficiencia renal
- 15 aguda, insuficiencia renal crónica, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.
- En una modalidad, el compuesto de la invención se usa para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.
- En una modalidad, el compuesto de la invención se usa para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada.
- 20 En un aspecto, el compuesto de la invención puede usarse para el tratamiento de trastornos de crecimiento, lo que incluye una estatura corta que puede relacionarse con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, y las comorbilidades relacionadas.
- En algunas modalidades, el compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en acondroplasia, hipocondroplasia, displasia
- 25 tanatofórica tipo 1 y tipo 2, deficiencia de SHOX, síndrome de Noonan, Costello, síndrome de LEOPARD, estatura corta idiopática, estatura corta autosómica dominante, deficiencia de hormona del crecimiento, raquitismo hipofosfatémico, deficiencia de CNP, deficiencia de agrecano, mutación NPR2 heterocigótica, artrosis, craniosinostosis, (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Jackson- Weiss, síndrome de Pfeiffer, o síndrome
- 30 crouzonodermosquelital), síndrome lacrimo-aurículo-dento-digital (LADD), displasia osteoglofónica, y SADDAN (acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans).

En algunas modalidades, el compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en osteogénesis imperfecta, acondrogénesis, condrodisplasia punctata, acondroplasia homocigótica, tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, displasia espondiloepifisaria congénita, fémur corto congénito, displasia mesomélica tipo Langer, neurofibromatosis, síndrome de Legius y neurofibromatosis tipo 1.

En algunas modalidades, el compuesto de la invención puede usarse en el tratamiento de fenotipos relacionados con trastornos de crecimiento, lo que incluye una estatura corta que puede relacionarse con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, seleccionada del grupo que consiste en retraso del crecimiento, deformidades del cráneo, defectos de ortodoncia, compresión de la médula cervical, estenosis espinal, dolor en relación con la displasia esquelética, hidrocefalia, pérdida auditiva debida a otitis crónica, enfermedad cardiovascular, enfermedad neurológica y obesidad.

A menos que se indique de otra forma en la descripción, los términos presentados en forma singular pueden incluir, además, la situación en plural.

Lista de modalidades

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes:

Modalidad 1: un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador, en donde la carga neta del compuesto a pH fisiológico es 0 o negativa, en donde el péptido CNP comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula I:

AA₀₁- AA₀₂-AA₀₃-AA₀₄-AA₀₅-AA₀₆-AA₀₇-AA₀₈-AA₀₉-AA₁₀-AA₁₁-AA₁₂-AA₁₃-AA₁₄-AA₁₅-AA₁₆-
AA₁₇-AA₁₈-AA₁₉-AA₂₀-AA₂₁-AA₂₂-AA₂₃-AA₂₄-AA₂₅-AA₂₆-AA₂₇-AA₂₈-AA₂₉-AA₃₀-AA₃₁-AA₃₂-
AA₃₃-AA₃₄-AA₃₅-AA₃₆-AA₃₇

en donde

AA₀₁ es Gln o está ausente,

AA₀₂ es Glu o está ausente,

AA₀₃ es His o está ausente,

AA₀₄ es Pro o está ausente,

AA₀₅ es Asn o Gln o Glu o está ausente,

AA₀₆ es Ala o está ausente,

AA₀₇ es Arg o His o Ala o está ausente,

AA₀₈ es Lys o Ser o His o está ausente,

AA₀₉ es Tyr o Glu o está ausente

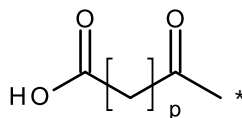
AA₁₀ es Lys o Glu o Gln o His o está ausente,

- AA₁₁ es Gly,
 AA₁₂ es Ala,
 AA₁₃ es Gln o Asn o Glu,
 AA₁₄ es Lys o His o Glu,
 5 AA₁₅ es Lys Ser o Glu o Thr o His,
 AA₁₆ es Gly,
 AA₁₇ es Leu o Gly o Ser o Val,
 AA₁₈ es Ser o His
 AA₁₉ es Gln o Ser o Lys o His,
 10 AA₂₀ es Gly,
 AA₂₁ es Cys,
 AA₂₂ es Phe,
 AA₂₃ es Gly,
 AA₂₄ es Leu,
 15 AA₂₅ es Pro o Lys,
 AA₂₆ es Leu,
 AA₂₇ es Asp o Glu,
 AA₂₈ es Arg,
 AA₂₉ es Ile,
 20 AA₃₀ es Gly,
 AA₃₁ es Ser,
 AA₃₂ es Leu o Nle o Met,
 AA₃₃ es Ser,
 AA₃₄ es Gly,
 25 AA₃₅ es Leu,
 AA₃₆ es Gly y
 AA₃₇ es Cys;

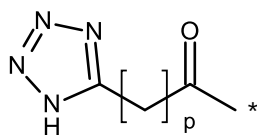
en donde el grupo modificador comprende el Quím. A, el Quím. B y el Quím. C;

en donde el Quím. A se selecciona del grupo que consiste en:

30



(Quím. A1) y



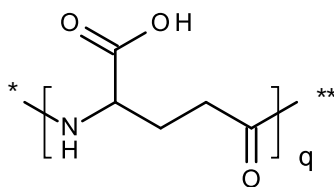
5 (Quím. A2)

en donde p es un número entero en el intervalo de 14-20, y

donde * denota un enlace amida que conecta el Quím. A y el Quím. B; y

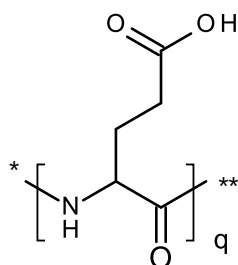
en donde el Quím. B se selecciona del grupo que consiste en: Quím. B1 y Quím. B2

10



(Quím. B1) y

15



20 (Quím. B2)

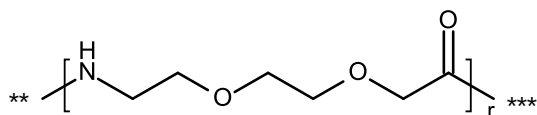
en donde q es un número entero en el intervalo de 1-8,

en donde * denota un enlace amida que conecta el Quím. A- y el Quím. B-,

en donde ** denota un enlace amida que conecta el Quím. B- y el Quím. C-; y

en donde el Quím. C se selecciona del grupo que consiste en:

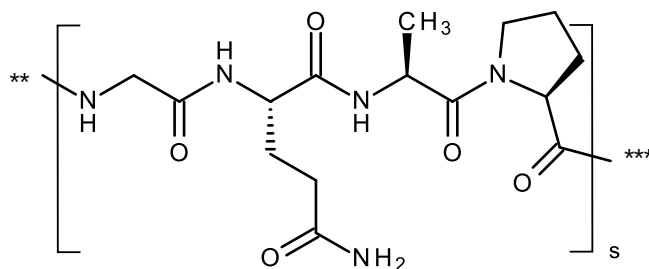
25



(Quím. C1),

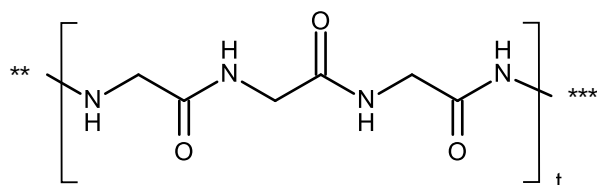
30

5



(Quím. C2) y

10



(Quím. C3)

en donde r es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde s es un número entero en el intervalo de 0-3,

15

en donde t es un número entero en el intervalo de 0-1, en donde

** denota un enlace amida que conecta el Quím. B- y el Quím. C-,

en donde *** denota un enlace amida que conecta el Quím. alfa-amino C- y N-terminal en el péptido CNP.

20

Modalidad 2: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde AA₁₃ del péptido CNP es Gln; AA₁₉ es Gln o Ser; AA₂₅ es Pro; y AA₃₂ es Leu.

Modalidad 3: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde AA₅ del péptido CNP es Gln; AA₁₃ es Gln; AA₁₉ es Gln o Ser; AA₂₅ es Pro; y AA₃₂ es Leu.

Modalidad 4: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde el péptido CNP comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

25	YKGANKKGLSKGCFGLKLDRI GSXSGLGC	SEQ ID NO: 6
	NARKYKGANKSGLSSGCFGLKLDRI GSXSGLGC	SEQ ID NO: 7
	GANKKGLSKGCFGLKLDRI GSXSGLGC	SEQ ID NO: 8
	GAQKKGLSKGCFGLKLDRI GSXSGLGC	SEQ ID NO: 9
	YEGAQKKGLSKGCFGLKLDRI GSL SGLGC	SEQ ID NO: 10
30	EEGAQKKGLSKGCFGLKLDRI GSL SGLGC	SEQ ID NO: 11
	YEGAQEKGLSKGCFGLKLDRI GSL SGLGC	SEQ ID NO: 12

	YEGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 13
	YEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 14
	YEGAQEKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 15
	YEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 16
5	YEGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 17
	EKGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 18
	EKGAQEKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 19
	EQGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 20
	YKGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 21
10	YKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 22
	EHGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 23
	YHGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 24
	YHGAQEKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 25
	YHGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 26
15	YHGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 27
	YEGAEEKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 28
	EGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 29
	EGAQKEGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 30
	YEGAQKEGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 31
20	YHGAQKTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 32
	YHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 33
	YHGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 34
	YKGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 35
	EHGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 36
25	EHGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 37
	EHGAQKKGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 38
	EHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 39
	YHGAQHHGLSKGCFGLKLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 40
	YKGAQHHGLSQGCFGLKLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 41
30	YEGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 42
	EGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 43

	YKGAQHHGLSQGCFGLKLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 44
	YKGAQHHGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 45
	YHGAQHHGLSKGCFGLKLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 46
	YHGAQHHGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 47
5	GAQKKGLSHGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 48
	GAQKKGLHSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 49
	ARKYHGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 50
	ARKYHGAQHTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 51
	ARKYHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 52
10	ARKEHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 53
	ARKEHGAQHTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 54
	YEGAQKKGSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 55
	QEHPQARSYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 57
	QEHPARSYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 58
15	QEHPQAHKYHGAQHHGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 59
	QEHPQAHKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 60
	QEHPQAHKYHGAQKHGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 61
	ARKYEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 63
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 64
20	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 67
	QEHPQARKYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 68
	YEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 69
	QEHPQARKYEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 70
	QEHPQAAKYEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 71
25	QEHPQARHYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 72
	QEHPQAHKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 73
	QEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 74
	QEHPQARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 75
	QEHPQARKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 76
30	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 77
	ARKYHGAQHTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 78

	ARKYKGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 79
	ARKYHGAQKKGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 80
	ARKYHGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 81
	ARKYKGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 82
5	YHGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 83
	ARKYHGAQKSGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 84
	YEGAQKKGGSHGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 85
	ARKYEGAQHKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 86
	YHGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 87
10	YKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 88
	YKGAQKKGVVSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 89
	YHGAQKKGVVSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 90
	QEHPQARKYEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 91
	ARKYHGAQKKGVSSGCFGLPLERIGSLSLGC	SEQ ID NO: 92
15	ARKYKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 96
	YHGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 97
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLKLDIGSLSLGC	SEQ ID NO: 98
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 99
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSMGLGC	SEQ ID NO: 100
20	QEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 101
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSLGC	SEQ ID NO: 102
	YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 103
	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSLGC	SEQ ID NO: 104
	YKGAQKKGGSQGCFGLPLERIGSLSLGC	SEQ ID NO: 108
25	YKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSLGC	SEQ ID NO: 109
	GAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 112
	GAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 113
	GAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 114
	GAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSLGC	SEQ ID NO: 115
30	GAQKKGLSQGCFGLKLDIGSLSLGC	SEQ ID NO: 116
	GAQKKGLSSGCFGLKLDIGSLSLGC	SEQ ID NO: 117

	GAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 118
	GAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 119
	GANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 120
	GANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 121
5	GANKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 122
	GANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 123
	GAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 124
	GAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 125
	GAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 126
10	GAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 127
	GAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 128
	GAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 129
	GAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 130
	GAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 131
15	GANKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 132
	GANKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 133
	GANKKGLSQGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 134
	GANKKGLSSGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 135
	GAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 136
20	GAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 137
	GAQKKGSSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 138
	GAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 139
	GANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 140
	GANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 141
25	GAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 142
	GAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 143
	GAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 144
	YKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 145
	YKGAQKKGLSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 146
30	YKGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 147
	YKGAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 148

	YKGAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 149
	YKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 150
	YKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 151
	YKGANKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 152
5	YKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 153
	YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 154
	YKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 155
	YKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 156
	YKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 157
10	YKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 158
	YKGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 159
	YKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 160
	YKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 161
	YKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 162
15	YKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 163
	YKGANKKGLSQGCFGLPLERIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 164
	YKGANKKGLSSGCFGLPLERIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 165
	YKGAQKKGGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 166
	YKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 167
20	YKGAQKKGGSSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 168
	YKGAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 169
	YKGANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 170
	YKGANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 171
	YKGAQKKGGSSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 172
25	YKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 173
	YKGAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 174
	ARKYKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 175
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 176
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 177
30	ARKYKGAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 178
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 179

	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 180
	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 181
	ARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 182
	ARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 183
5	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 184
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 185
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 186
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 187
	ARKYKGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 188
10	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 189
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 190
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 191
	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 192
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLERIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 193
15	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLERIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 194
	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 195
	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 196
	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLKLDIGSLSGLC	SEQ ID NO: 197
	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLKLDIGSLSGLC	SEQ ID NO: 198
20	ARKYKGANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 199
	ARKYKGANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 200
	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 201
	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGMSGSLGC	SEQ ID NO: 202
	ARKYKGAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 203
25	GAQKKGSSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 232

Modalidad 5: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde el péptido CNP tiene una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

	YKGANKKGLSKGCFGLKLDIGSXSGLC	SEQ ID NO: 6
	NARKYKGANKSGLSSGCFGLKLDIGSXSGLC	SEQ ID NO: 7
30	GANKKGLSKGCFGLKLDIGSXSGLC	SEQ ID NO: 8
	GAQKKGLSKGCFGLKLDIGSXSGLC	SEQ ID NO: 9

	YEGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 10
	EEGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 11
	YEGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 12
	YEGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 13
5	YEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 14
	YEGAQEKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 15
	YEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 16
	YEGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 17
	EKGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 18
10	EKGAQEKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 19
	EQGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 20
	YKGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 21
	YKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 22
	EHGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 23
15	YHGAQEKGLSKGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 24
	YHGAQEKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 25
	YHGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 26
	YHGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 27
	YEGAEKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 28
20	EGAQEKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 29
	EGAQKEGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 30
	YEGAQKEGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 31
	YHGAQKTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 32
	YHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 33
25	YHGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 34
	YKGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 35
	EHGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 36
	EHGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 37
	EHGAQKKGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 38
30	EHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 39
	YHGAQHHGLSKGCFGLKLERIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 40

	YKGAQHHGLSQGCFGLKLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 41
	YEGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 42
	EGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 43
	YKGAQHHGLSQGCFGLKLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 44
5	YKGAQHHGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 45
	YHGAQHHGLSKGCFGLKLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 46
	YHGAQHHGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 47
	GAQKKGLSHGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 48
	GAQKKGLHSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 49
10	ARKYHGAQHTGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 50
	ARKYHGAQHTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 51
	ARKYHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 52
	ARKEHGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 53
	ARKEHGAQHTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 54
15	YEGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 55
	QEHPQARSYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 57
	QEHPQRSYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 58
	QEHPQAHKYHGAQHHGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 59
	QEHPQAHKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 60
20	QEHPQAHKYHGAQKHGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 61
	ARKYEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 63
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 64
	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 67
	QEHPQARKYEGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 68
25	YEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 69
	QEHPQARKYEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 70
	QEHPQAAKYEGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 71
	QEHPQARHYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 72
	QEHPQAHKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 73
30	QEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 74
	QEHPQARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 75

	QEHPQARKYKGAQKKGGSQGCFLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 76
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 77
	ARKYHGAQHTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 78
	ARKYKGAQKTGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 79
5	ARKYHGAQKKGVSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 80
	ARKYHGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 81
	ARKYKGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 82
	YHGAQKTGVSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 83
	ARKYHGAQKSGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 84
10	YEGAQKKGGSHGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 85
	ARKYEGAQHKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 86
	YHGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 87
	YKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 88
	YKGAQKKGVSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 89
15	YHGAQKKGVSSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 90
	QEHPQARKYEGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 91
	ARKYHGAQKKGVSSGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 92
	YHGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 97
	ARKYKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 96
20	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLKLDIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 98
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 99
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 100
	QEHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 101
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 102
25	YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 103
	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 104
	YKGAQKKGGSQGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 108
	YKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 109
	GAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 112
30	GAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 113
	GAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSLGLGC	SEQ ID NO: 114

	GAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 115
	GAQKKGLSQGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 116
	GAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 117
	GAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 118
5	GAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 119
	GANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 120
	GANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 121
	GANKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 122
	GANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 123
10	GAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 124
	GAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 125
	GAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 126
	GAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 127
	GAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 128
15	GAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 129
	GAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 130
	GAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 131
	GANKKGLSQGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 132
	GANKKGLSSGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 133
20	GANKKGLSQGCFGLPLERIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 134
	GANKKGLSSGCFGLPLERIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 135
	GAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 136
	GAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 137
	GAQKKGSSQGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 138
25	GAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 139
	GANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 140
	GANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 141
	GAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 142
	GAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSMMSGGLGC	SEQ ID NO: 143
30	GAQKKGSSKGCFLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 144
	YKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLGC	SEQ ID NO: 145

	YKGAQKKGLSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 146
	YKGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 147
	YKGAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 148
	YKGAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 149
5	YKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 150
	YKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 151
	YKGANKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 152
	YKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 153
	YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 154
10	YKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 155
	YKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 156
	YKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 157
	YKGAQKKGLSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 158
	YKGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 159
15	YKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 160
	YKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 161
	YKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 162
	YKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 163
	YKGANKKGLSQGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 164
20	YKGANKKGLSSGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 165
	YKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 166
	YKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 167
	YKGAQKKGSSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 168
	YKGAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 169
25	YKGANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 170
	YKGANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 171
	YKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 172
	YKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 173
	YKGAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 174
30	ARKYKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 175
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 176

	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 177
	ARKYKGAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 178
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 179
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 180
5	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 181
	ARKYKGANKKGGSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 182
	ARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 183
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 184
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 185
10	ARKYKGAQKKGGSQGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 186
	ARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 187
	ARKYKGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 188
	ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 189
	ARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 190
15	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 191
	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 192
	ARKYKGANKKGLSQGCFGLPLERIGMSGLGC	SEQ ID NO: 193
	ARKYKGANKKGLSSGCFGLPLERIGMSGLGC	SEQ ID NO: 194
	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 195
20	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 196
	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 197
	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 198
	ARKYKGANKKGSSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 199
	ARKYKGANKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 200
25	ARKYKGAQKKGSSQGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 201
	ARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGMSGLGC	SEQ ID NO: 202
	ARKYKGAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 203
	QEHPQARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 204
	QEHPQARKYKGAQKKGLSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 205
30	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 206
	QEHPQARKYKGAQKKGGSQGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 207

	QEHPQARKYKGAQKKGGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 208
	QEHPNARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 209
	QEHPNARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 210
	QEHPNARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 211
5	QEHPNARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 212
	QEHPQARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 213
	QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 214
	QEHPQARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 215
	QEHPQARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 216
10	QEHPQARKYKGAQKKGGSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 217
	QEHPQARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 218
	QEHPNARKYKGANKKGLSQGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 219
	QEHPNARKYKGANKKGLSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 220
	QEHPNARKYKGANKKGLSQGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 221
15	QEHPNARKYKGANKKGLSSGCFGLPLERIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 222
	QEHPQARKYKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 223
	QEHPQARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 224
	QEHPQARKYKGAQKKGSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 225
	QEHPQARKYKGAQKKGSSSGCFGLKLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 226
20	QEHPNARKYKGANKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 227
	QEHPNARKYKGANKKGGSSSGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 228
	QEHPQARKYKGAQKKGSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 229
	QEHPQARKYKGAQKKGSSSGCFGLPLDRIGSMSGLGC	SEQ ID NO: 230
	QEHPQARKYKGAQKKGSSKGCFGLPLDRIGSLSGLC	SEQ ID NO: 231
25	GAQKKGSSGCFGLPLERIGSLSGLC	SEQ ID NO: 232

Modalidad 6: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde el péptido CNP tiene una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- GAQKKGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 136),
 ARKYKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 77),
 30 YKGAQKKGGSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 88),
 YKGAQKKGLSQGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 103),
 QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 67) y

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLERIGLSGLGC (SEQ ID NO: 104).

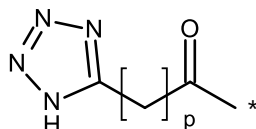
Modalidad 7: el compuesto de CNP de acuerdo con la modalidad 1, en donde el péptido CNP tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGLSGLGC (SEQ ID NO: 67).

5 Modalidad 8: el compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el grupo modificador está unido covalentemente al alfa-amino N-terminal del péptido CNP.

Modalidad 9: el compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Quím. A del grupo modificador tiene una p de 16.

10 Modalidad 10: el compuesto de CNP de acuerdo con las modalidades 1-8, en donde el Quím. A del grupo modificador es el Quím. A2

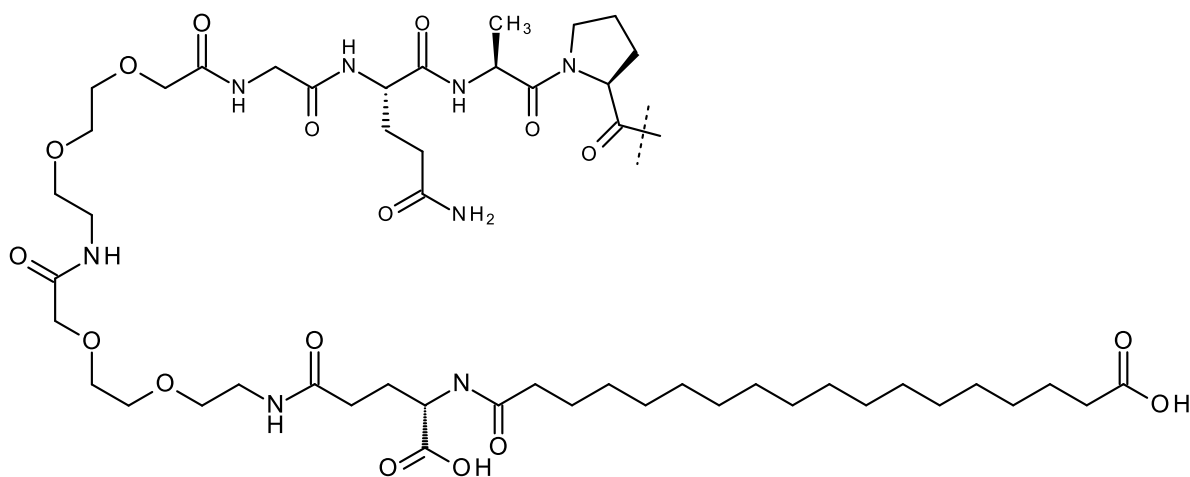


(Quím. A2)

15 en donde p es 16.

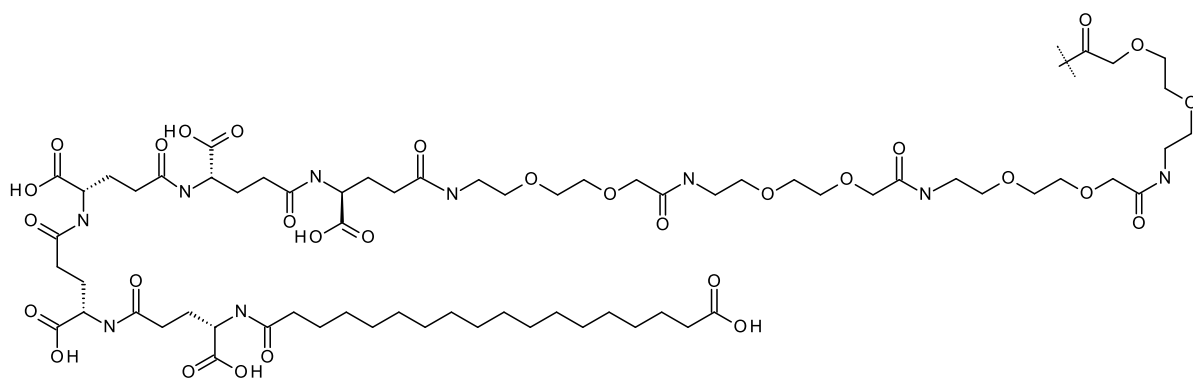
Modalidad 11: el compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el Quím. B del grupo modificador tiene una q de 1-5.

20 Modalidad 12: el compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el grupo modificador se selecciona de los siguientes ejemplos no limitantes Quím. E, Quím. F, Quím. G, Quím. H, Quím. I y Quím. J (en los que la línea de puntos define la unión a través de un enlace amida al péptido CNP)



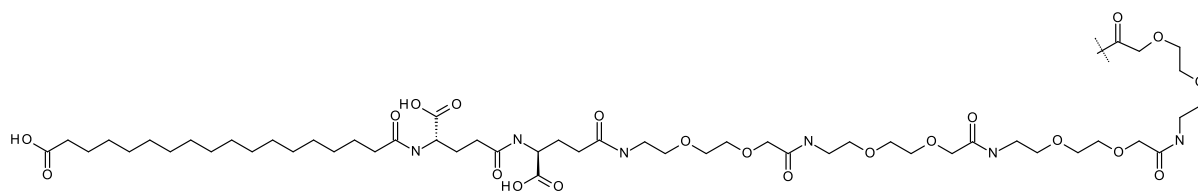
(Quím. E)

5



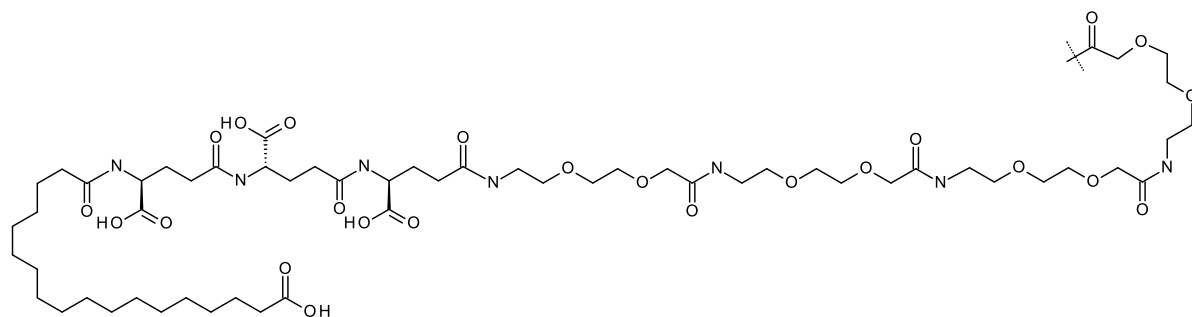
(Quím. F)

10



(Quím. G)

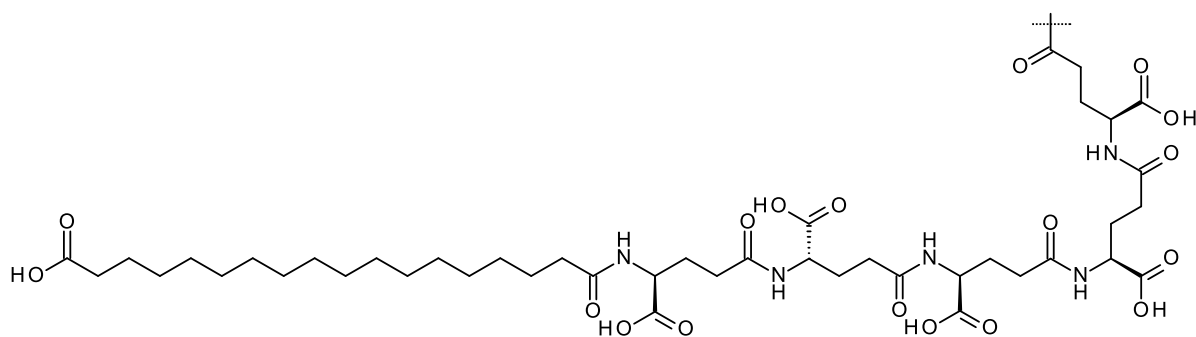
15



20

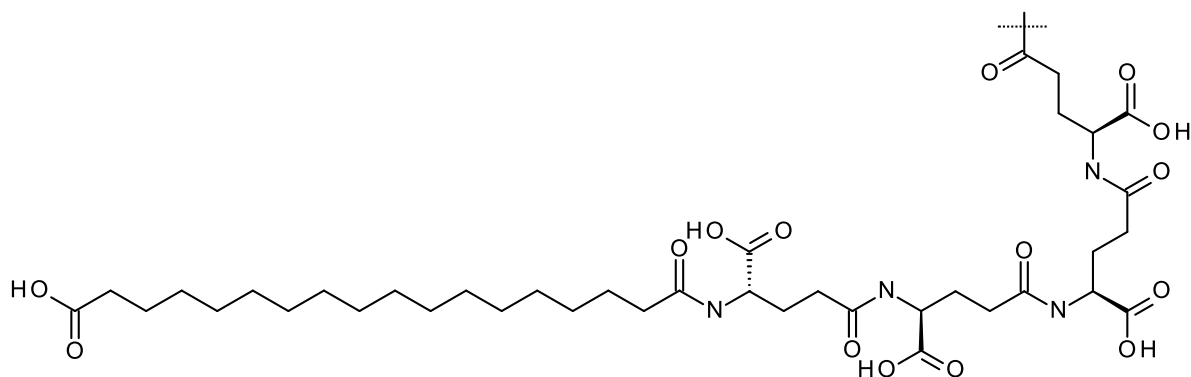
(Quím. H)

25



(Quím. I)

30



(Quím. J).

Modalidad 13: el compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el grupo modificador es el Quím. I.

Modalidad 14: un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador que comprende un Quím. A, un Quím. B y un Quím. C, en donde el compuesto está de acuerdo con uno cualquiera de los compuestos descritos en la Tabla 1 (ver más abajo).

Modalidad 15: un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador, en donde el compuesto está de acuerdo con uno cualquiera de los compuestos descritos en la Tabla 1a.

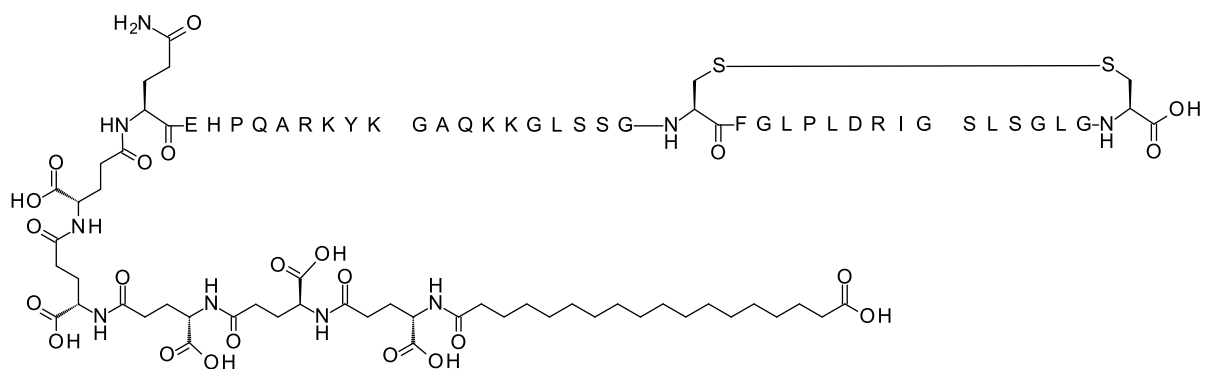
Tabla 1a:

ID del compuesto	Grupo modificador		Péptido CNP: con modificaciones de secuencia frente a CNP37	SEQ ID NO
9384	C18d	gGlu-2xOEG-1xGQAP	des1-10, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	62
9407	C18d	5xgGlu-4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
9435	C18d	2xgGlu-4xOEG	des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	88
9480	C18d	3xgGlu-4xOEG	des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L	103
9482	C18d	5xgGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L	67
9483	C18d	4xgGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L	104

Modalidad 16: un compuesto de CNP que comprende un péptido CNP y un grupo modificador, en donde el péptido CNP tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, QEHPQARKYKGAQKKGLSSGCFGLPLDRIGSLSGLC (SEQ ID NO: 67), y en donde el grupo modificador es el Quím. I.

Modalidad 17: un compuesto de CNP de acuerdo con la Fórmula II:

5

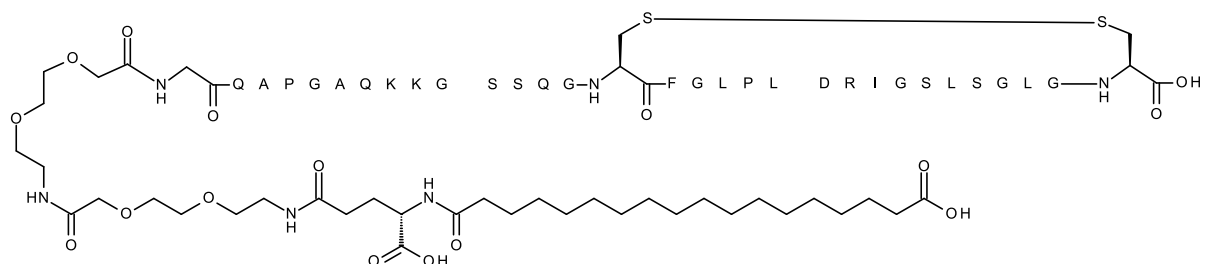


(Fórmula II).

10

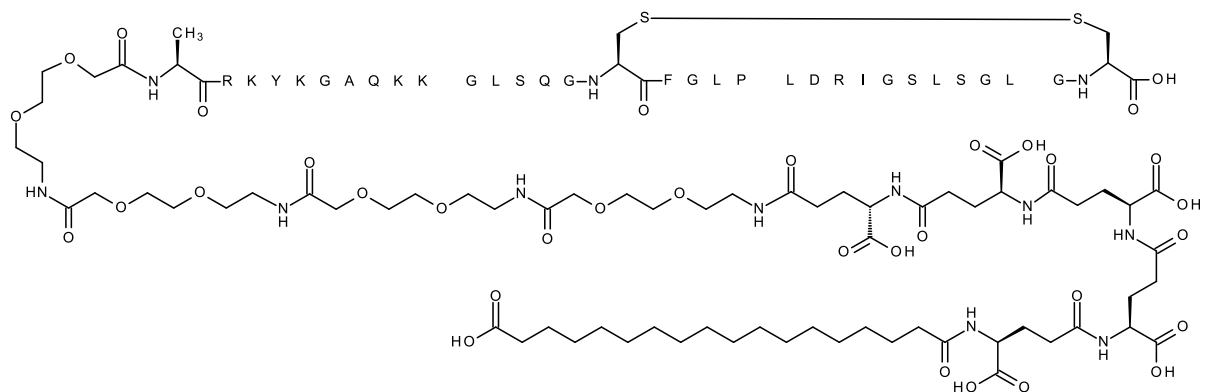
Modalidad 18: un compuesto de CNP de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV, V, VI y VII:

15



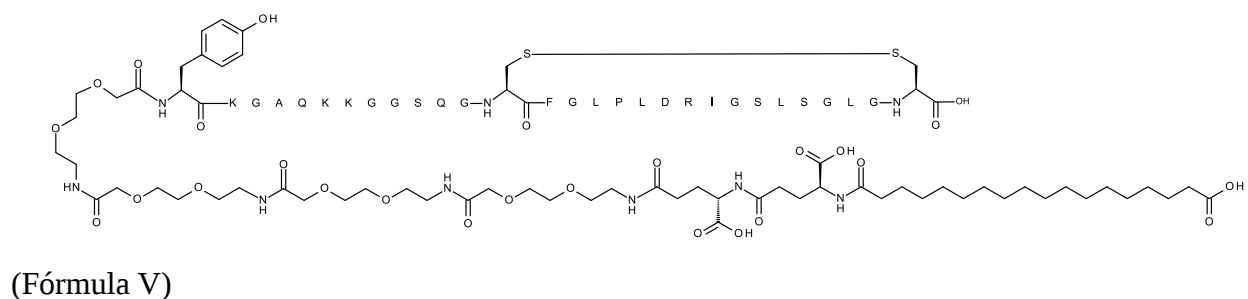
(Fórmula III)

20

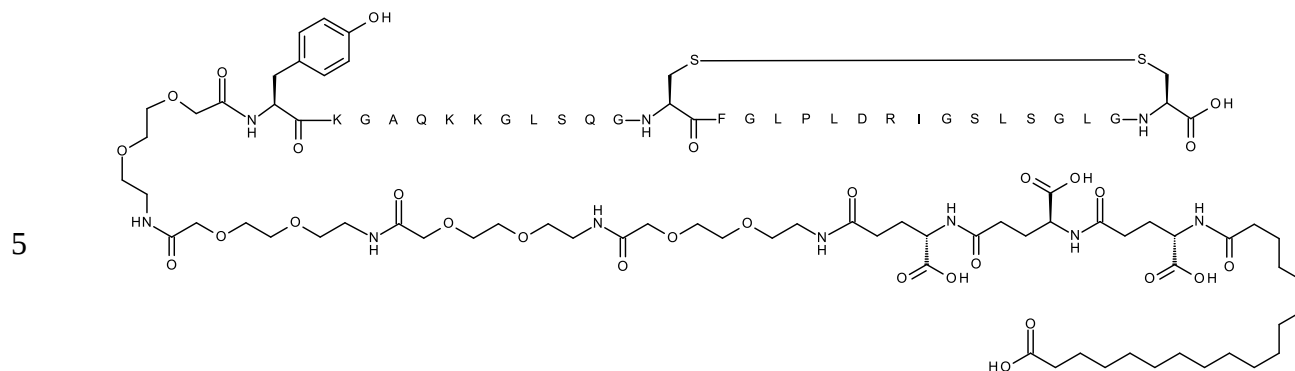


25 (Fórmula IV)

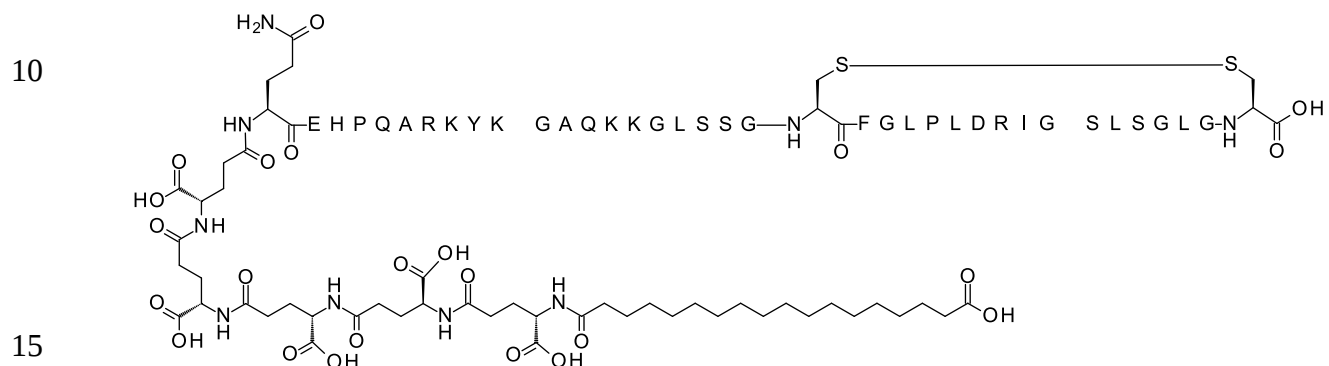
30



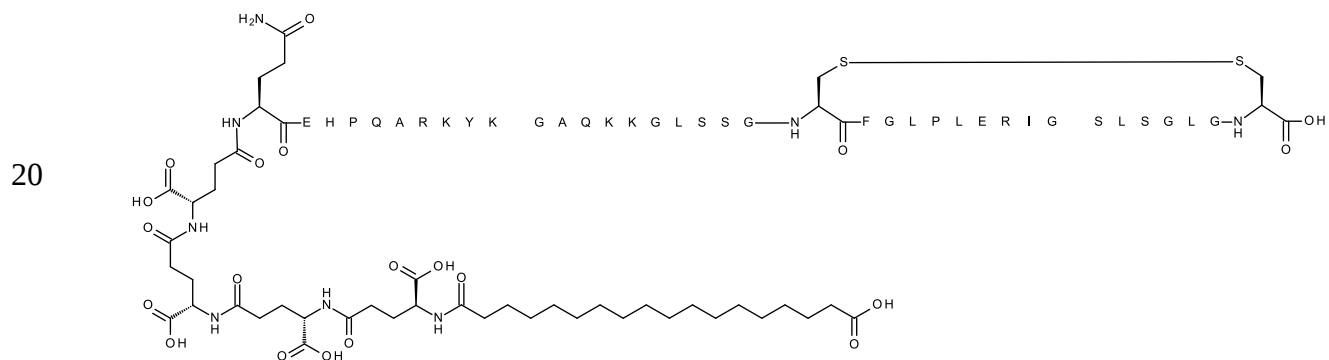
(Fórmula V)



(Fórmula VI)



(Fórmula II)



(Fórmula VII)

25 Modalidad 19: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde la carga neta del compuesto de CNP a pH fisiológico es de 0 a -4, determinada como se describe en el ejemplo 4.

30 Modalidad 20: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una semivida *in vivo* después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 10 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

Modalidad 21: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una semivida *in vivo* después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 20 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

5 Modalidad 22: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una semivida *in vivo* después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 30 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

Modalidad 23: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una semivida *in vivo* después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 40 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

10 Modalidad 24: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una semivida *in vivo* después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 50 horas, determinada como se describe en el ejemplo 12.

15 Modalidad 25: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una biodisponibilidad después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 40 %, determinada como se describe en el ejemplo 12.

Modalidad 26: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una biodisponibilidad después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 50 %, determinada como se describe en el ejemplo 12.

20 Modalidad 27: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una biodisponibilidad después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 60 %, determinada como se describe en el ejemplo 12.

Modalidad 28: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una biodisponibilidad después de la administración s.c. a minicerdos Göttingen de al menos 70 %, determinada como se describe en el ejemplo 12.

25 Modalidad 29: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una solubilidad de al menos 2,000 μM a pH 4 o pH 6.5, medida como se describe en el ejemplo 5.

30 Modalidad 30: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una solubilidad de al menos 3,000 μM a pH 4 o pH 6.5, medida como se describe en el ejemplo 5.

Modalidad 31: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-18, en donde el compuesto tiene una solubilidad de al menos 4,000 μM a pH 4 o pH 6.5, medida como se describe en el ejemplo 5.

5 Modalidad 32: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-31 en donde el compuesto comprende un puente disulfuro intramolecular que da como resultado una estructura cíclica.

Modalidad 33: una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Modalidad 34: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de enfermedades cardio-renales-metabólicas.

15 Modalidad 35: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades cardio-renales-metabólicas, que incluyen el grupo que consiste en hipertensión, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, infarto agudo de miocardio, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardiaca aguda descompensada, insuficiencia cardiaca congestiva, edema cardiaco, edema renal, edema hepático*, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

20 Modalidad 36: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de la insuficiencia cardiaca congestiva.

Modalidad 37: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de la insuficiencia cardiaca descompensada.

25 Modalidad 38: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de trastornos del crecimiento, que incluyen una estatura corta que puede relacionarse con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, y las comorbilidades relacionadas.

30 Modalidad 39: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de la acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica tipo 1 y tipo 2, deficiencia de SHOX, síndrome de Noonan, Costello, síndrome de LEOPARD, estatura corta idiopática, estatura corta

autosómica dominante, deficiencia de hormona del crecimiento, raquitismo hipofosfatémico, deficiencia de CNP, deficiencia de agrecano, mutación NPR2 heterocigótica, artrosis, craniosinostosis, (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome de Pfeiffer, o síndrome crouzonodermosquelital), síndrome
5 lacrimo-aurículo-dento-digital (LADD), displasia osteoglofónica, y SADDAN (acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans).

Modalidad 40: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o prevención de la osteogénesis imperfecta, acondrogénesis, condrodisplasia punctata, acondroplasia homocigótica,
10 tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, displasia espondiloepifisaria congénita, fémur corto congénito, displasia mesomélica tipo Langer, neurofibromatosis, síndrome de Legius y neurofibromatosis tipo 1.

Modalidad 41: el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33, para el uso en el tratamiento o la prevención de
15 fenotipos relacionados con trastornos del crecimiento, que incluyen estatura corta que puede estar relacionada con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, seleccionados del grupo que consiste en retardo del crecimiento, deformidades en el cráneo, defectos de ortodoncia, compresión de la médula cervical, estenosis espinal, dolor en relación con la displasia esquelética, hidrocefalia, pérdida auditiva debida a otitis crónica, enfermedad cardiovascular, enfermedad neurológica, y
20 obesidad.

Modalidad 42: un método para tratar o prevenir enfermedades cardio-renales-metabólicas, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

Modalidad 43: un método para tratar o prevenir enfermedades cardio-renales-metabólicas, que
25 incluyen el grupo que consiste en hipertensión, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, infarto agudo de miocardio, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca congestiva, edema cardíaco, edema renal, edema hepático*, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, resistencia a la insulina, y diabetes tipo 2, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una
30 cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

Modalidad 44: un método para tratar o prevenir trastornos de crecimiento, lo que incluye una estatura corta que puede relacionarse con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, y las

comorbilidades relacionadas, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

5 Modalidad 45: un método para tratar o prevenir la acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica tipo 1 y tipo 2, deficiencia de SHOX, síndrome de Noonan, Costello, síndrome de LEOPARD, estatura corta idiopática, estatura corta autosómica dominante, deficiencia de hormona del crecimiento, raquitismo hipofosfatémico, deficiencia de CNP, deficiencia de agrecano, mutación NPR2 heterocigótica, artrosis, craniosinostosis, (por ejemplo, síndrome de Muenke, síndrome de Crouzon, síndrome de Apert, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome de Pfeiffer, o síndrome
10 crouzonodermosquelital), síndrome lacrimo-aurículo-dento-digital (LADD), displasia osteoglofónica, y SADDAN (acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans), que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

15 Modalidad 46: un método para tratar o prevenir la osteogénesis imperfecta, acondrogénesis, condrodisplasia punctata, acondroplasia homocigótica, tipo rizomélico de condrodisplasia punctata, displasia congénita espondiloepifisaria, fémur corto congénito, displasia mesomélica de tipo Langer, neurofibromatosis, síndrome de Legius y neurofibromatosis tipo 1, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las
20 modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

Modalidad 47: un método para tratar o prevenir fenotipos relacionados con trastornos del crecimiento, lo que incluye la estatura corta que puede relacionarse con la displasia esquelética relacionada con FGFR3, seleccionados del grupo que consiste en retardo del crecimiento, deformidades en el cráneo, defectos de ortodoncia, compresión de la médula cervical, estenosis
25 espinal, dolor en relación con la displasia esquelética, hidrocefalia, pérdida auditiva debida a otitis crónica, enfermedad cardiovascular, enfermedad neurológica, y obesidad, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-32, o una composición de acuerdo con la modalidad 33.

30 EJEMPLOS

Materiales y métodos

Lista de abreviaturas

	2-ClTrt	Resina 2-clorotritilo
	Aldritiol-4	Disulfuro de 4,4'-dipiridilo
	AUC	Área bajo la curva
	BEH	Híbrido con puente de etileno
5	Boc	Terc-butiloxycarbonilo
	C18d	Ácido octadecanodioico
	C20d	Ácido eicosanodioico
	CAD	Detector de aerosol cargado
	GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
10	CL	Aclaramiento
	CSH	Híbrido de superficie cargada
	DCM	Diclorometano
	DgGlu	gamma-glutamilo de configuración D
	DIC	N, N-diisopropilcarbodiimida
15	DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
	DMF	Dimetilformamida
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DTT	Ditiotreitol
	EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
20	ESI	Ionización por electropulverización
	F%	Biodisponibilidad
	Fd	Faraday
	Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonilo
	FPLC	Cromatografía líquida de proteína rápida
25	gGlu	Gammaglutamoilo
	HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il]etano-1-sulfónico
	HFIP	Hexafluoro-2-propanol
	HMWP	Proteína de alto peso molecular
	HSA	Albúmina sérica humana
30	i.v.	Intravenosa
	IPA	Isopropanol
	LCMS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas

	LLOQ	Límite inferior de cuantificación
	LYD	Landrace, Yorkshire y Duroc
	MeCN	Acetonitrilo
	MMPX	8-Metoximetil-3-isobutil 1-metilxantina
5	MS	Espectrometría de masas
	NAD	No se detectaron anomalías
	NCA	Análisis no compartimental
	n.d.	No detectado
	Nle (X)	Norleucina
10	NMP	N-metil-2-pirrolidona
	OEG	Oligoetilenglicol
	Oxyma Pure	Cianohidroxiiminoacetato de etilo
	Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
15	PD	Farmacodinámica
	PDA	Detección de matriz con fotodiodos
	PK	Farmacocinética
	QC	Control de calidad
	RP	Fase inversa
20	RPM	Rondas por minuto
	s.c.	Subcutánea
	SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
	SIL	Marcado con isótopo estable
	SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
25	T $\frac{1}{2}$	Semivida
	tBu	Terc-butilo
	Tetrazol-C18	Ácido 17-(2H-tetrazol-5-il)heptadecanoico
	TF	Tiempo de vuelo
	TFA	Ácido trifluoroacético
30	ThT	Tioflavina T
	TIPS	Triisopropilsilano
	Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

Trt	Tritilo
TUV	TUV ajustable
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento
UV	Ultravioleta

5

Métodos generales de preparación

Método A: Síntesis de péptidos en fase sólida

Los péptidos pueden sintetizarse mediante síntesis de péptidos en fase sólida que se conoce bien en la técnica, más abajo se describen métodos usados para sintetizar los compuestos ejemplificados de la presente invención.

La síntesis de compuestos se realizó en un sintetizador de péptidos en fase sólida SymphonyX (GYROS Protein Technologies AB, Tucson, AZ).

Típicamente, la síntesis se realizó mediante el uso de 450 μ mol de resina, pero también se usaron síntesis mediante el uso de 150 o 300 μ mol de resina. En una síntesis típica, la resina se lavó en DMF. Después del lavado con DMF, la resina se incubó con aminoácido protegido con Fmoc (5 eq., 0.3 M en Oxyma Pure 0.3 M en DMF, 7.5 ml), DIC (5 eq., 0.75 M en DMF, 3.0 ml) y colidina (5 eq., 0.75 M en DMF, 3.0 ml) durante 30 min. A continuación, se añadió DIC adicional (5 eq., 0.75 M en DMF, 3.0 ml) y la resina se incubó durante 90 min. Después de cada acoplamiento, la resina se tapó mediante tratamiento con anhídrido acético (1 M, 7.5 ml) y colidina (0.75 M, 3.0 ml) en DMF durante 20 min. Los ácidos grasos se acoplaron mediante el uso de éster mono-terc-butílico de ácidos grasos (5 eq., 0.3 M en Oxyma Pure 0.3 M, 7.5 ml), DIC (5 eq., 0.75 M en DMF, 3.0 ml) y colidina (5 eq., 0.75 M en DMF, 3.0 ml) durante 6 h.

Los aminoácidos protegidos con Fmoc usados fueron los estándares recomendados:

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Nle-OH, suministrados por, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech o NovabioChem. Donde no se especifica nada más, se usaron las formas L de origen natural de los aminoácidos. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, pueden usarse dipéptidos de pseudoprolina (ver también W.R. Sampson y otros J. Pept. Sci. 1999, 5, 403-409).

Para los péptidos acilados en cualquier posición durante la SPPS, los siguientes bloques de construcción adecuadamente protegidos tales como, pero no limitados a, Fmoc-ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanóico y Boc-Glu(Fmoc)-OH se suministraron de, por ejemplo, Anaspec, Bachem, Iris Biotech o Novabiochem.

- 5 Se preparó el éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico y el éster mono-terc-butílico del ácido eicosanodioico como se conoce en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2010102886 A1.

El ácido 17-(2H-tetrazol-5-il)heptadecanoico (Tetrazol-C18) se incorporó al acoplar el bloque de construcción protegido ácido (S)-4-(17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanamido)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico que se sintetizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se añadieron
10 secuencialmente tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 5.87 g, 16.5 mmol) y N-metilmorfolina (NMM, 8.00 ml, 72.8 mmol) a una suspensión agitada de ácido 17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoico (5.10 g, 15.0 mmol) en DMF seco (70 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió H-
15 L-Glu-OtBu (éster 1-terc-butílico del ácido L-glutámico, 4.58 g, 22.5 mmol) en una porción. La suspensión se convirtió en una solución amarilla en 5 minutos. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas y después se vertió en una solución agitada helada de ácido clorhídrico (35 %, 20 ml) en agua (1 l). El producto crudo se filtró y se lavó con agua (3 x 100 ml) y se secó poco después en una frita sinterizada de vidrio por succión y se volvió a disolver en DMF (70 ml). Esta
20 solución se vertió en agua (1 l), la suspensión resultante se agitó durante 5 minutos y el sólido se filtró, se lavó con agua (3 x 100 ml) y se secó a vacío. El producto crudo se disolvió en acetato de etilo (400 ml) y se filtró a través de una columna de gel de sílice (gel de sílice 60, 0.040-0.063 mm) (100 g) y la columna se lavó mediante acetato de etilo (600 ml). El acetato de etilo se eliminó a vacío. El residuo sólido se ebulló en 1,2-dicloroetano (200 ml) con agitación vigorosa durante 5
25 minutos, a continuación, la emulsión se dejó enfriar a temperatura ambiente en 5 minutos y se dejó cristalizar a la misma temperatura durante toda la noche. Los cristales cerosos se filtraron y lavaron mediante 1,2-diclorometano (50 ml) y n-heptano (100 ml) y se secaron al aire. Esta etapa de purificación se repitió una vez más. Finalmente, el compuesto se disolvió en 1,4-dioxano (50 ml) y se secó por congelación para proporcionar ácido (S)-4-(17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanamido)-5-
30 (terc-butoxi)-5-oxopentanoico como un polvo blanquecino.

Para los péptidos que presentan una cisteína C-terminal, la resina fue una H-Cys(Trt)-2-ClTrt precargada (por ejemplo, de Bachem o Novabiochem).

Método B: Escisión del péptido de la resina.

Después de la síntesis la resina se lavó con DCM, y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIPS/agua/DTT (por ejemplo, en las relaciones 90:5:2.5:2.5 o 92.5:2.5:2.5:5) seguido de precipitación con éter dietílico. El precipitado se centrifugó y se lavó varias veces con éter dietílico.

Método C: Formación de puentes disulfuro

El CNP nativo contiene un puente disulfuro que, si se reduce, suprime la unión al receptor NPR2. Los métodos para la formación de puentes disulfuro para los péptidos sintéticos se conocen bien en la técnica, más abajo se describen tres métodos usados para preparar los compuestos ejemplificados de la presente invención.

Plegamiento mediante el uso de aldritol-4

El péptido precipitado crudo de una síntesis de 150 μ mol se disolvió en 10 ml de DMSO, seguido de la adición de agua a 700 ml y la adición adicional de 100 ml de MeCN. Finalmente, se añadieron 2 ml de tampón NaOAc 0.5 M pH 5.0 a la solución peptídica. El pH se ajustó con NaOH 1 M a pH 5-6.5 hasta que la solución era transparente. La cantidad de péptido en solución se cuantificó mediante el uso de CAD y se preparó una solución madre nueva de aldritol-4 (2 mg/ml en MeOH). Se añadió 1.0 eq. de aldritol-4 en MeOH en comparación con el contenido del péptido durante 5-10 min bajo agitación vigorosa. La solución se agitó durante 10 min y se añadió 0.5 o 1.0 eq. adicionales de solución madre de aldritol-4. La reacción se inactivó con 2 ml de TFA una vez completada según se determinó mediante LCMS. El péptido se purificó mediante RP-HPLC como se describe más abajo.

Plegamiento mediante el uso de DMSO

El precipitado peptídico crudo de una síntesis de 450 μ mol se disolvió en MeCN/agua 1:1 (50 ml), y se añadió a un tampón Tris-HCl 500 mM pH 8.0 (1 l) y se diluyó con agua (1.4 l) y DMSO (600 ml). La solución se dejó con agitación suave durante 16-24 h a TA. La reacción se inactivó mediante la adición de 5.0 eq. de yodoacetamida (50 mM en agua), a continuación, se acidificó después de 10 min con TFA a pH 2 y se diluyó a 5 l con agua. El péptido se purificó mediante RP-HPLC como se describe más abajo.

Plegamiento mediante el uso de tampón redox de cisteína/cistina o cisteamina/cistamina

El precipitado peptídico crudo a partir de una síntesis de 150 μ mol se disolvió en DMSO (20 ml) y se añadió a un tampón Tris-HCl 50 mM, cisteína 3 mM, cistina 0.3 mM pH 8,2 (800 ml) o un tampón Tris-HCl 50 mM, cisteamina 3 mM, cistamina 0.3 mM pH 8,2. La solución se dejó con agitación

suave durante 16-24 h a TA. La reacción se inactivó mediante la adición de 3 ml de TFA, se diluyó con 100 ml de MeCN y se purificó mediante RP-HPLC como se describe más abajo.

Método D: Purificación

Los métodos de purificación de péptidos se conocen bien en la técnica, más abajo se describen dos métodos usados para purificar los compuestos ejemplificados de la presente invención.

HPLC preparativa de fase inversa mediante el uso de eluyentes ácidos

Los péptidos plegados crudos se purificaron mediante HPLC preparativa de fase inversa en un Waters Delta Prep 4000 o un sistema Gilson Modelo 322 H2 equipado con una columna C18, por ejemplo, una Waters Xbridge Prep C18 OBD, 5 μ m, 250 x 50 mm o una Phenomenex Gemini Axia NX C18, 5 μ m, 250 x 30 mm. El péptido se eluyó de la columna mediante el uso de un gradiente lineal de los eluyentes A (TFA al 0.1 % en agua) y B (TFA al 0.1 % en acetonitrilo), por ejemplo, del eluyente B al 27-42 % durante 30 min a un régimen de flujo constante de 25 ml/min (columna Ø30 mm) o del eluyente B al 30-40 % durante 10 min a 120 ml/min (columna Ø50 mm). Las fracciones de péptido con pureza aceptable se recolectaron, se combinaron y se liofilizaron para producir la sal de TFA del péptido como un polvo incoloro.

HPLC preparativa de fase inversa mediante el uso de eluyentes casi neutros

Si se requirió más purificación, la sal de TFA del péptido liofilizado se purificó en un sistema de HPLC preparativa similar en un eluyente de pH neutro o casi neutro, por ejemplo, eluyente A: NaOAc 100 mM pH 6.5, MeCN al 5 %; eluyente B: MeCN. El péptido se eluyó de la columna mediante el uso de un gradiente lineal de los eluyentes A y B, por ejemplo, del eluyente B al 25-55 % durante 30 min a un régimen de flujo constante de 60 ml/min (columna Ø50 mm). Las fracciones del péptido con pureza aceptable se recolectaron, se combinaron y desalaron mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos más abajo.

Método E: Resalar y desalar

En algunos casos, fue conveniente cambiar el contraión a sodio para facilitar la formulación a pH 6.5. Los métodos para intercambiar los contraiones del péptido se conocen bien en la técnica, más abajo se describe un método usado para cambiar el contraión para algunos de los compuestos ejemplificados de la presente invención.

Desalación mediante exclusión por tamaño

El contraión se intercambió al solubilizar la sal de TFA del péptido en NaOAc 400 mM pH 6.5 y MeCN al 20 % a 2-3 mg/ml. El péptido disuelto se desaló a continuación en un sistema FPLC Äkta Purifer mediante el uso de una columna de desalación HiPrep 26/10. La columna se equilibró

previamente con MeCN al 20 % y el péptido se inyectó y eluyó sobre 1.5 CV de MeCN al 20 % isocrático a 6 ml/min. El péptido se recolectó, se cuantificó mediante análisis CAD y se liofilizó para producir la sal de sodio del péptido como un polvo incoloro.

Métodos generales de detección y caracterización:

- 5 Para confirmar la identidad, medir la pureza y cuantificar la cantidad de un péptido sintético preparado, el péptido se caracteriza mediante el uso de métodos tales como LCMS y UPLC de fase inversa, que se conocen bien en la técnica. Más abajo se describen los métodos usados para caracterizar los compuestos ejemplificados de la presente invención.

Método F: Métodos de cromatografía analítica

- 10 Los compuestos de CNP preparados se caracterizaron mediante RP-UPLC y LCMS y la cantidad preparada se cuantificó mediante RP-UPLC/CAD.

LCMS34

- La LCMS se realizó en una configuración que consiste de un sistema UPLC Waters Acquity y un espectrómetro de masas QTOF Xevo G2-XS. El sistema se equipó con una columna UPLC Waters
15 ACQUITY BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm, temperatura de la columna 60 °C. La detección por UV fue a 214 nm. El modo de ionización de MS fue ESI+.

- Eluyente A: ácido fórmico al 0.1 % en agua; eluyente B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo. El análisis se realizó mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente, 1-10 μ l) sobre la columna que se eluyó con un gradiente lineal de los eluyentes A y B del eluyente
20 B al 5-95 % durante 4.0 min a un régimen de flujo constante de 0.4 ml/min.

RP-UPLC107:

- Alternativamente, la LCMS se realizó en una configuración que consiste de un sistema UPLC Waters ACQUITY y un detector de masa Waters QDA. El sistema se equipó con una columna UPLC Waters
25 ACQUITY BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm, temperatura de la columna 40 °C. La detección por UV fue a 214 nm.

- Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; eluyente B: TFA al 0.05 % en acetonitrilo. El análisis se realizó mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente, 1-10 μ l) sobre la columna que se eluyó con un gradiente lineal de los eluyentes A y B del eluyente B al 5-60 % durante 1.6 min a un régimen de flujo constante de 0.9 ml/min.

- 30 RP-UPLC02:

La RP-UPLC02 se realizó en un sistema UPLC Waters ACQUITY con un detector TUV o PDA. El sistema se equipó con una columna UPLC Waters ACQUITY BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mm x 150 mm,

temperatura de la columna 40 °C. La detección por UV fue a 214 nm. Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; eluyente B: TFA al 0.05 % en acetonitrilo.

El análisis se realizó mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente, 1-10 µl) sobre la columna que se eluyó con un gradiente lineal de los eluyentes A y B del eluyente B al 5-95 % durante 16.0 min a un régimen de flujo constante de 0.4 ml/min.

RP-UPLC61:

La RP-UPLC61 se realizó en un sistema UPLC Waters ACQUITY con un detector TUV o PDA. El sistema se equipó con una columna UPLC Waters ACQUITY BEH Shield C18, 1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm, temperatura de la columna 60 °C. La detección por UV fue a 214 nm. Eluyente A: Na₂SO₄ 20 mM, Na₂HPO₄ 2 mM, NaH₂PO₄ 2 mM en agua/MeCN 9:1, pH 7.2; eluyente B: MeCN/agua 7:3. El análisis se realizó mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferentemente, 1-10 µl) en la columna que se eluyó con un gradiente lineal de los eluyentes A y B de B al 5-20 % durante 3 min, después B al 20-80 % durante 17 min, después B al 80-90 % durante 1 min a un régimen de flujo constante de 0.4 ml/min.

Cuantificación del péptido por CAD02:

El CAD se realizó en un sistema UPLC Thermo Scientific Vanquish con UV-DAD y CAD (detector de aerosol cargado). El sistema se equipó con una columna UPLC Waters ACQUITY CSH C18, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, temperatura de la columna 40 °C. La detección por UV fue a 214 nm. Eluyente A: TFA al 0.1 % v/v en agua; eluyente B: TFA al 0.1 % v/v en MeCN. El análisis se realizó mediante la inyección de un volumen apropiado de la muestra sobre la columna que se eluyó con un gradiente lineal de los eluyentes A y B de B al 0-95 % durante 4 min a un régimen de flujo constante de 0.45 ml/min. La calibración se realizó mediante el uso de una curva estándar generada mediante la inyección de un estándar externo de insulina aspart, 3.55 mg/ml.

Método G – Preparación de formulaciones de compuestos de CNP para experimentos *in vivo*

Las formulaciones para los estudios *in vivo* se prepararon de acuerdo con los principios descritos más abajo.

Procedimiento: Las formulaciones usadas para los estudios *in vivo* se prepararon al disolver el péptido liofilizado en tampones de formulación con composiciones idénticas a las formulaciones finales (la composición de la formulación final se especifica en el ejemplo 9 al ejemplo 15). Se han usado las siguientes composiciones de formulación final:

- pH 4.0: acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4.0
- pH 4.0: acetato de sodio 5 mM, propilenglicol 240 mM, pH 4.0

- pH 4.0: acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, polisorbato 20 al 0.007 %, pH 4.0
 - pH 6.0: fosfato de sodio 20 mM, propilenglicol 223 mM, pH 6.0
 - pH 6.5: fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5
 - pH 7.4: fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4
- 5 • pH 7.4: fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, polisorbato 20 al 0.007 %, pH 7.4
- pH 7.5: fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.5
 - pH 5.5: monohidrato de ácido cítrico 1.33 mM; citrato 3.67 mM, trisódico; trehalosa 52 mg/ml; D-manosa 15 mg/ml; L-metionina 0.73 mg/ml; polisorbato 80 0.05 mg/ml, pH 5.5

El procedimiento de formulación fue por razones prácticas ligeramente diferente para las formulaciones de pH 6.5 en comparación con las formulaciones de otros pH objetivos.

Formulaciones a pH 6.5: El péptido liofilizado se disolvió en un tampón pH 7.4 (fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4) a una concentración nominal de 20-50 % por encima de la concentración del péptido objetivo y el pH se ajustó a pH 6.5 mediante el uso de NaOH 0.2 N o HCl 0.2 N. La concentración real del péptido se determinó mediante el uso de CAD (Método F, CAD02)

15 y se añadió un volumen de un tampón pH 6.5 (fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5) para alcanzar una concentración nominal correspondiente a la concentración del péptido objetivo y el pH se ajustó a pH 6.5 mediante el uso de NaOH 0.2 N o HCl 0.2 N. La concentración real del péptido se determinó mediante el uso de CAD (Método F, CAD02). La formulación se esterilizó por filtración (0.22 μ m), la concentración final del péptido se determinó mediante el uso de CAD

20 (Método F, CAD02) y la formulación se llenó en contenedores estériles.

Formulaciones a pH 4.0, pH 6.0, pH 7.4 y pH 7.5: El péptido liofilizado se disolvió en un tampón de formulación con una composición correspondiente a la composición de la formulación final (especificada en el ejemplo 9 al ejemplo 15) a una concentración nominal de 20-50 % por encima de la concentración del péptido objetivo y el pH se ajustó al objetivo mediante el uso de NaOH 0.2

25 N o HCl 0.2 N. La concentración del péptido real se determinó mediante el uso de CAD (Método F, CAD02) y se añadió un volumen del mismo tampón de formulación para alcanzar una concentración nominal correspondiente a la concentración del péptido objetivo y el pH se ajustó al objetivo mediante el uso de NaOH 0.2 N o HCl 0.2 N. La concentración real del péptido se determinó mediante el uso de CAD (Método F, CAD02). La formulación se esterilizó por filtración (0.22 μ m),

30 la concentración final del péptido se determinó mediante el uso de CAD (Método F, CAD02) y la formulación se llenó en contenedores estériles.

Ejemplo 1: Síntesis de compuestos de CNP

Los compuestos de CNP se sintetizaron y caracterizaron de acuerdo con los métodos generales de preparación descritos anteriormente. Los compuestos de CNP ejemplificados y sus constituyentes se resumen en la Tabla 1. Los elementos prolongadores y enlazadores, de la Tabla 1, forman juntos el grupo modificador de los compuestos de CNP.

5 Tabla 1: Resumen de los compuestos ejemplificados Quím. 1-148

	Quím. Núm.	ID del compuesto	Prolongador (Quím A)	Enlazador (Quím B-C)	Modificaciones de secuencia de CNP37	SEQ ID
	1	0065			des1-15 (CNP22)	1
	2	1510			(CNP37)	2
10	3	0312	C18d	gGlu-2xOEG	des1-4, 5Q, 13Q, 32Nle	3
	4	0776	C18d	gGlu-2xOEG	des1-5, 13Q, 27E, 32L	4
	5	1235	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 32L	5
	6	0262	C18d	6xgGlu	des1-8, 32Nle	6
	7	0296	C18d	6xgGlu	des1-4, 15S, 19S, 32Nle	7
15	8	0313	C18d	5xgGlu	des1-10, 32Nle	8
	9	0334	C18d	5xgGlu	des1-10, 13Q, 32Nle	9
	10	1221	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 32L	10
	11	1222	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 9E, 10E, 13Q, 32L	11
20	12	1223	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 14E, 32L	12
	13	1224	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 32L	13
	14	1225	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 25P, 32L	14
	15	1226	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 14E, 25P, 32L	15
25	16	1227	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	16
	17	1228	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L	17
	18	1229	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 9E, 13Q, 14E, 32L	18
	19	1230	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 9E, 13Q, 14E, 19S, 32L	19
30	20	1231	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 9E, 10Q, 13Q, 14E, 32L	20
	21	1232	C18d	gGlu-2xOEG	des1-8, 13Q, 14E, 32L	21

5	22	1233	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L	22
	23	1236	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 14E, 32L	23
	24	1237	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14E, 32L	24
	25	1240	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14E, 25P, 32L	25
	26	1241	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 19S, 25P, 32L	26
10	27	1242	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L	27
	28	1274	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13E, 19Q, 25P, 32L	28
	29	1287	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-9, 10E, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L	29
	30	1288	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-9, 10E, 13Q, 15E, 19S, 25P, 32L	30
	31	1289	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 15E, 19S, 25P, 32L	31
15	32	1290	C18d	2xgGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	16
	33	1302	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 15T, 19S, 25P, 32L	32
	34	1303	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	33
	35	1304	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L	34
	36	1305	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L	35
20	37	1309	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 25P, 32L	36
	38	1310	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 19S, 25P, 32L	37
	39	1311	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 32L	38
	40	1312	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	39
	41	1322	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 27E, 32L	40
25	42	1323	C18d	2xgGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 27E, 32L	40
	43	1324	C18d	2xgGlu- 2xOEG	des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 27E, 32L	41
	44	1338	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L	42
30						

5	45	1339	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-9, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	43
	46	1340	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 32L	44
	47	1341	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 25P, 32L	45
	48	1345	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 32L	46
	49	1346	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 25P, 32L	47
10	50	1347	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-10, 13Q, 19H, 25P, 32L	48
	51	1348	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-10, 13Q, 18H, 19S, 25P, 32L	49
	52	1350	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L	50
	53	1351	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	51
	54	1352	C18d	gGlu- 3xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	33
15	55	1353	C18d	gGlu- 3xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 25P, 32L	36
	56	1354	C18d	2xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	52
	57	1355	C18d	gGlu- 3xOEG	des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L	22
	58	1356	C18d	2xgGlu- 3xOEG	des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L	22
	59	1357	C18d	2xgGlu- 3xOEG	des1-8, 9E, 10H, 13Q, 32L	5
20	60	1359	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-5, 9E, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	53
	61	1360	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-5, 9E, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	54
	62	1375	C18d	gGlu- 4xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 25P, 32L	14
	63	1376	C20d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 25P, 32L	14
	64	1377	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 17G, 25P, 32L	55
25	65	1378	C18d	gGlu- 2xOEG- GGG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	56
	66	1379	C18d	gGlu- 2xOEG	5Q, 8S, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	57
	67	1380	C18d	gGlu- 2xOEG	5E, 8S, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	58
30						

5	68	1381	C18d	gGlu- 2xOEG	5Q, 7H, 10H, 13Q, 14H, 15H, 17S, 19Q, 25P, 32L	59
	69	1382	C18d	3xgGlu- 2xOEG	5Q, 7H, 13Q, 19Q, 25P, 32L	60
	70	1383	C18d	2xgGlu- 2xOEG	5Q, 7H, 10H, 13Q, 15H, 17S, 19Q, 25P, 32L	61
	71	9384	C18d	gGlu- 2xOEG- GQAP	des1-10, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	62
	72	1385	C18d	4xgGlu	des1-5, 10E, 13Q, 25P, 32L	63
10	73	1386	C18d	4xgGlu	des1-5, 13Q, 19S, 25P, 32L	64
	74	1387	C18d	4xgGlu- GGG	des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L	65
	75	1388	C18d	GGG	des1-8, 13Q, 25P, 32L	66
	76	1389	C18d	4xgGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L	67
	77	1390	C18d	4xgGlu	5Q, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	68
15	78	1391	C18d	gGlu- 4xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 17G, 25P, 32L	55
	79	1392	C18d	gGlu- 4xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L	16
	80	1393	C18d	gGlu- 4xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 19Q, 25P, 32L	69
	81	1394	C18d	gGlu- 2xOEG	5Q, 10E, 13Q, 19Q, 25P, 32L	70
	82	1395	C18d	gGlu- 2xOEG	5Q, 7A, 10E, 13Q, 19Q, 25P, 32L	71
20	83	1396	C18d	2xgGlu- 2xOEG	5Q, 10E, 13Q, 19Q, 25P, 32L	70
	84	1398	C18d	4xgGlu- 2xOEG	5Q, 8H, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	72
	85	1399	C20d	4xgGlu- 2xOEG	5Q, 8H, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	72
	86	1400	C18d	4xgGlu- 2xOEG	5Q, 7H, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	73
	87	1401	C18d	8xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 32L	74
25	88	1402	C18d	6xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75
	89	1403	C18d	6xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	76
	90	1404	C18d	6xgGlu- 4xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75
	91	1405	C20d	6xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75
	92	1406	C18d	5xgGlu- 4xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75

5	93	9407	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
	94	1419	C18d	2xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	51
	95	1420	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 25P, 32L	78
	96	1421	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	79
	97	1422	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 32L	80
10	98	1423	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L	81
	99	1424	C18d	4xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L	82
	100	1425	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L	83
	101	1426	Tetrazole- C18	2xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 15S, 19Q, 25P, 32L	84
	102	1431	C18d	gGlu- 4xOEG	des1-8, 10E, 13Q, 17G, 19H, 25P, 32L	85
15	103	1432	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-5, 10E, 13Q, 14H, 17G, 19Q, 25P, 32L	86
	104	1434	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	87
	105	9435	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	88
	106	1436	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 17V, 19Q, 25P, 32L	89
	107	1437	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 17V, 19Q, 25P, 32L	90
20	108	1448	C18d	4xgGlu	5Q, 10E, 13Q, 25P, 32L	91
	109	1449	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	51
	110	1450	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L	52
	111	1451	C18d	3xgGlu- 2xOEG	des1-5, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 27E, 32L	92
	112	1452	C18d	5xgGlu- 3xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
30	113	1453	C18d	5xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
	114	1454	C18d	4xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
	115	1455	C18d	4xgGlu- 3xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
	116	1456	C18d	4xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77

5	117	1457	C18d	gGlu- 2xOEG- 3xGQAP	des1-10, 13Q, 19Q, 25P, 32L	93
	118	1458	C18d	gGlu- 2xOEG- 2xGQAP	des1-10, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	94
	119	1459	C18d	4xgGlu- 2xOEG- GQAP	des1-5, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	95
	120	1460	C18d	6xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 25P, 32L	96
	121	1461	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 10H, 13Q, 19Q, 25P, 32L	97
10	122	1462	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 25P, 32L	96
	123	1463	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 32L	98
	124	1464	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 19Q, 25P, 32L	99
	125	1465	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P	100
	126	1470	C18d	5xgGlu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 25P, 32L	96
15	127	1471	C18d	5xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75
	128	1472	C18d	4xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L	75
	129	1473	C18d	4xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L	67
	130	1474	C18d	5xgGlu- 2xOEG	5Q, 13Q, 25P, 32L	101
	131	1475	C18d	5xGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
20	132	1476	C18d	4x(Glu- Gly)-Glu- 2xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L	77
	133	1477	C18d	5xgGlu- 4xOEG	des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 27E, 32L	102
	134	1478	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L	103
	135	9480	C18d	3xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L	103
	136	1481	C18d	3xGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L	103
30	137	9482	C18d	5xgGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L	67
	138	9483	C18d	4xgGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L	104

5	139	1484	C18d	gGlu- 2xOEG- GQAP	des1-10, 13Q, 19Q, 25P, 32L	105
	140	1486	C18d	gGlu- 2xOEG- GQAP	des1-10, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 27E, 32L	106
	141	1487	C18d	gGlu- 2xOEG- 3xGQAP	des1-10, 13Q, 19Q, 25P, 32L	107
	142	1488	C18d	gGlu- 3xGQAP	des1-10, 13Q, 19Q, 25P, 32L	107
	143	1489	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 27E, 32L	108
10	144	1493	C18d	2xgGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 27E, 32L	109
15	145	1511	C18d	Glu- 2xOEG- GQAP	des1-10, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L	62
	146	1512	C18d	2xGlu- 4xOEG	des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L	88
	147	1513	C18d	5xGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L	110
	148	1514	C18d	4xGlu	5Q, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L	111
	149	1265	C18d	DgGlu- 2xOEG	des1-5, 6a, 7r, 8k, 9y, 10k, 12a, 13q, 14k, 15k, 17l, 18s, 19k, 21c, 22f, 24l, 25k, 26l, 27e, 28r, 29i, 31s, 32l, 33s, 35l, 37c	233
20	150	0106			-2P, -1G	234
	151	0089	C18d	gGlu- 2xOEG	des1-15	1
	152	0230	C18d	gGlu- 2xOEG- 5xGQAP	des1-15	235
	153	0231	C18d	gGlu- 8xOEG	des1-15	1

25 Quím. 1; Compuesto ID 0065; SEQ ID NO: 1
hCNP22

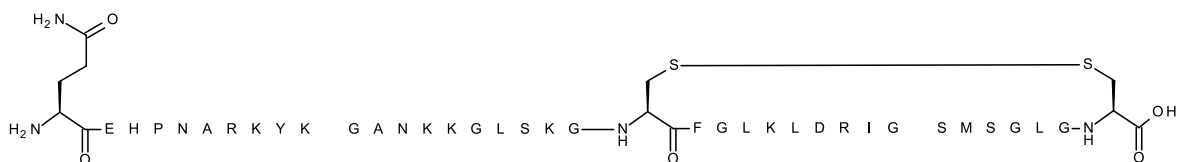


Peso molecular: 2,197.6008. LCMS34: m/3 calculado: 733.5336; m/3 encontrado: 733.7000; m/4 calculado: 550.4002; m/4 encontrado: 550.280

Quím. 2; Compuesto ID 1510; SEQ ID NO: 2

hCNP37

5

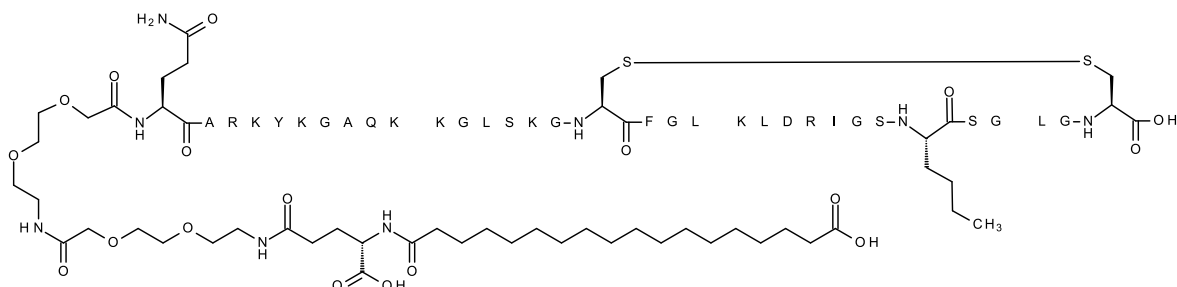


Peso molecular: 3,948.5589. UPLC107UPLC107: m/3 calculado: 1,317.1863

10 Quím. 3; Compuesto ID 0312; SEQ ID NO: 3

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-4, 5Q, 13Q, 32Nle]-hCNP37

15



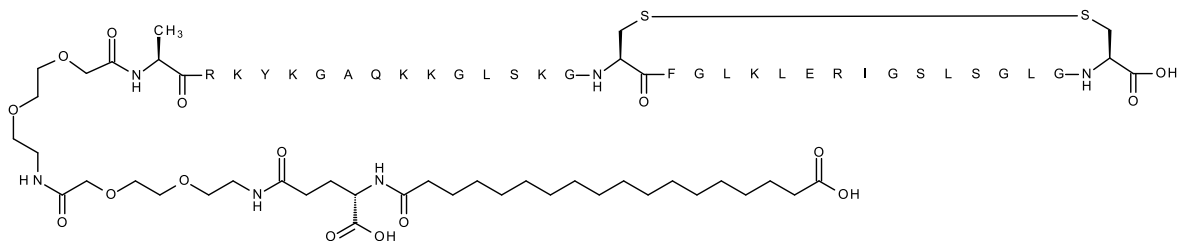
20 Peso molecular: 4,182.9477. LCMS34LCMS34: m/3 calculado: 1,395.3159; m/3 encontrado: 1,395.1200; m/4 calculado: 1,046.7369; m/4 encontrado: 1,046.600

Quím. 4; Compuesto ID 0776; SEQ ID NO: 4

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 27E, 32L]-hCNP37

25

30

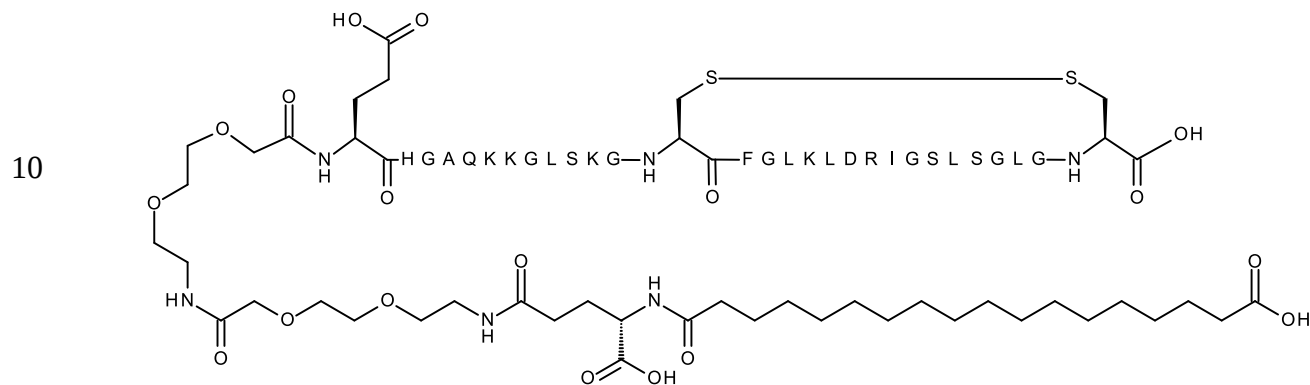


Peso molecular: 4,068.8451. LCMS34LCMS34: m/3 calculado: 1,357.2817; m/3 encontrado: 1,357.2694; m/4 calculado: 1,018.2113; m/4 encontrado: 1,018.2089

Quím. 5; Compuesto ID 1235; SEQ ID NO: 5

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 32L]-hCNP37

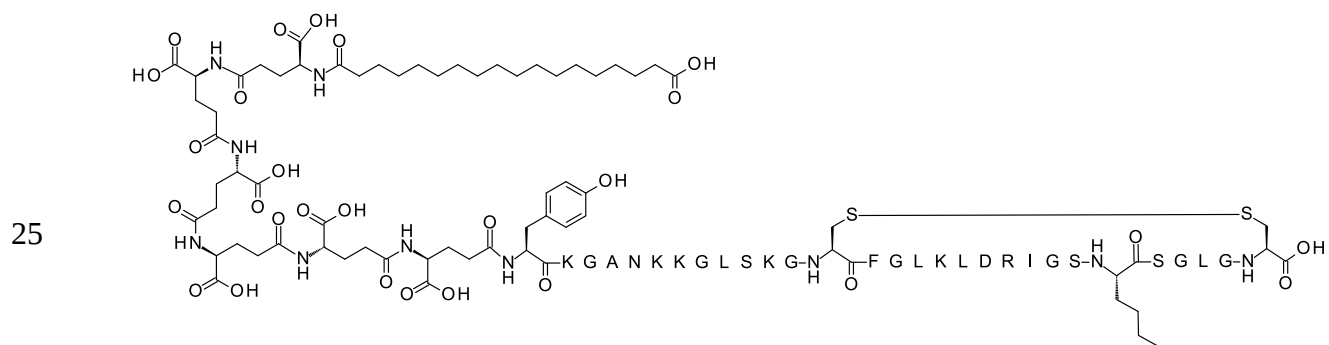


15 Peso molecular: 3,674.2904. UPLC107: m/3 calculado: 1,225.7635; m/3 encontrado: 1,225.5700

Quím. 6; Compuesto ID 0262; SEQ ID NO: 6

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-

20 carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)), des1-8, 32Nle]-hCNP37

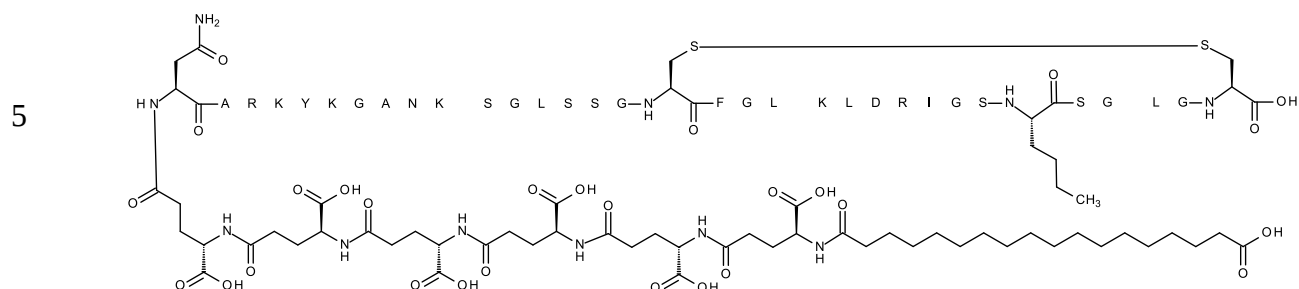


Peso molecular: 4,040.6131. LCMS34LCMS34: m/3 calculado: 1,347.8710; m/3 encontrado: 1,347.7200; m/4 calculado: 1,011.1533; m/4 encontrado: 1,010.7900

30 Quím. 7; Compuesto ID 0296; SEQ ID NO: 7

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]), des1-4, 15S, 19S, 32Nle]-hCNP37

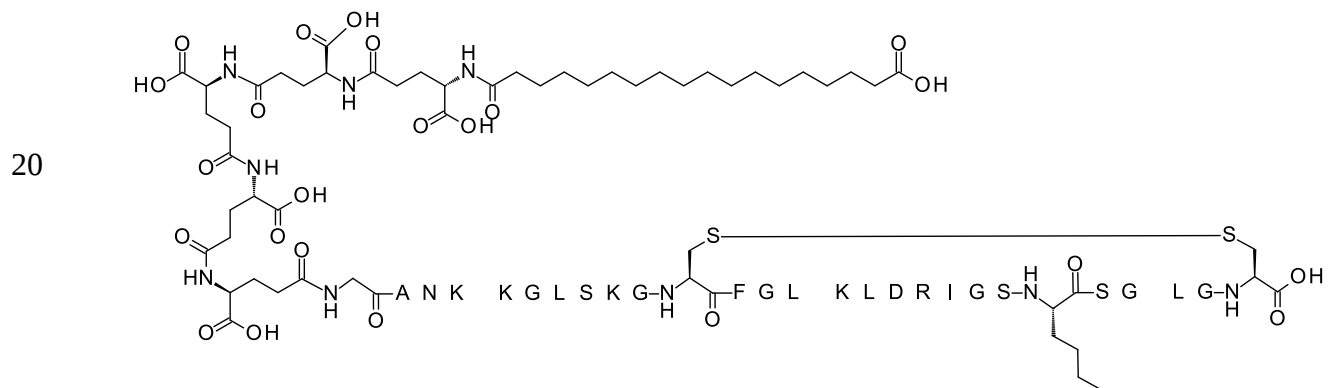


Peso molecular: 4,427.9616. LCMS34LCMS34: m/3 calculado: 1,476.9872; m/3 encontrado: 1,476.9200; m/4 calculado: 1,107.9904; m/4 encontrado: 1,108.1700

Quím. 8; Compuesto ID 0313; SEQ ID NO: 8

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-

carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]), des1-10, 32Nle]-hCNP37



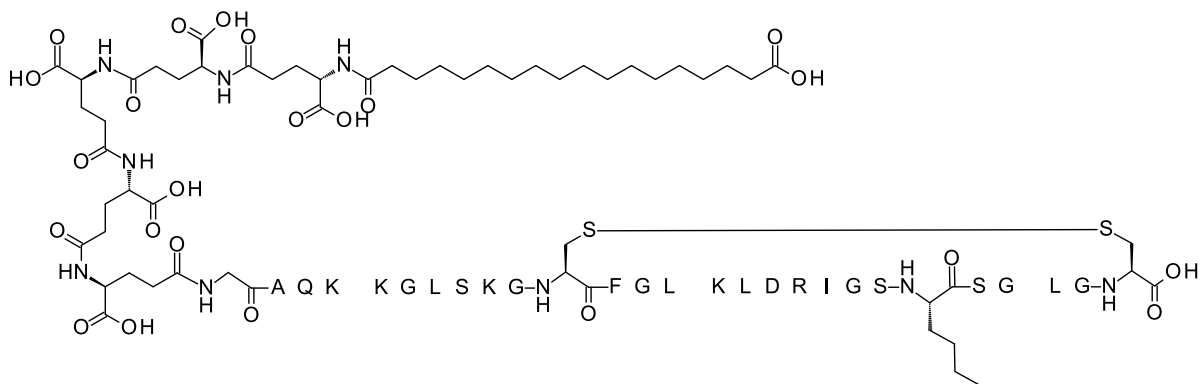
Peso molecular: 3,620.1536. LCMS34: m/3 calculado: 1,207.7179; m/3 encontrado: 1,207.6400; m/4 calculado: 906.0384; m/4 encontrado: 905.9900

Quím. 9; Compuesto ID 0334; SEQ ID NO: 9

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-

carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]), des1-10, 13Q, 32Nle]-hCNP37

5



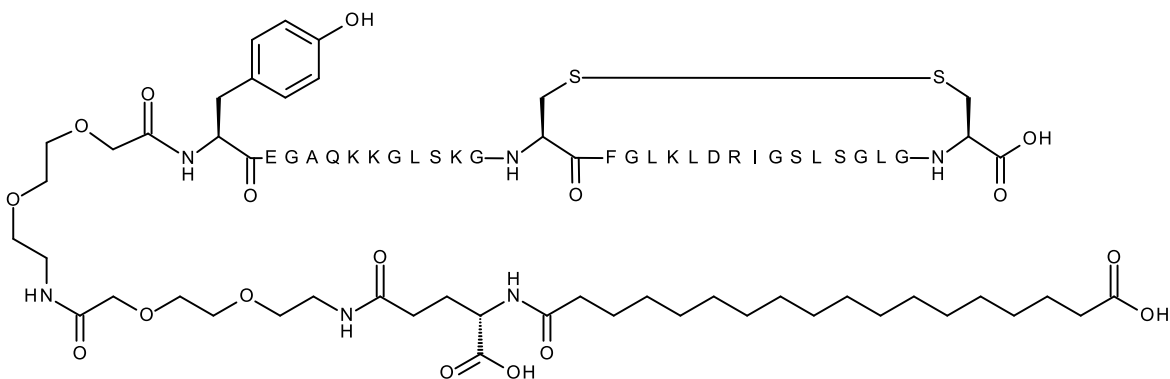
Peso molecular: 3,634.1801. LCMS34: m/3 calculado: 1,212.3934; m/3 encontrado: 1,212.3100;
m/4 calculado: 909.5450; m/4 encontrado: 909.2400

10

Quím. 10; Compuesto ID 1221; SEQ ID NO: 10

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,700.3243. UPLC107: m/3 calculado: 1,234.4414; m/3 encontrado: 1,234.2700

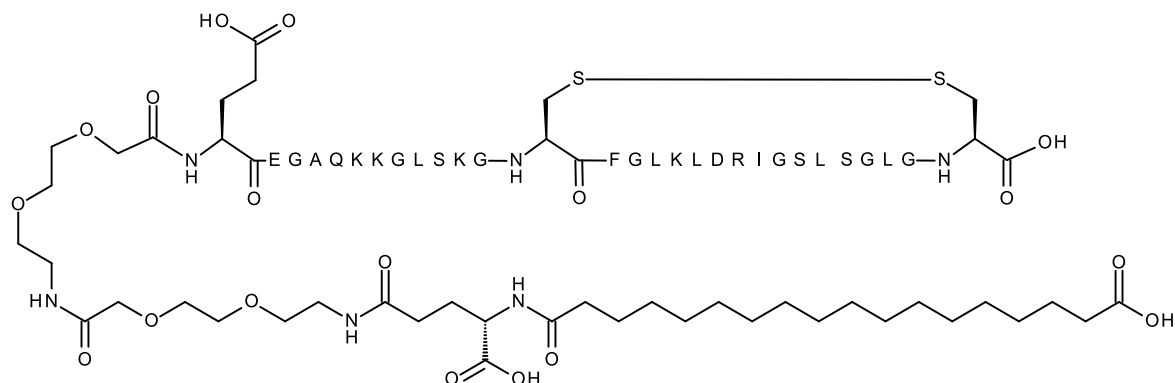
Quím. 11; Compuesto ID 1222; SEQ ID NO: 11

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10E, 13Q, 32L]-hCNP37

30

5



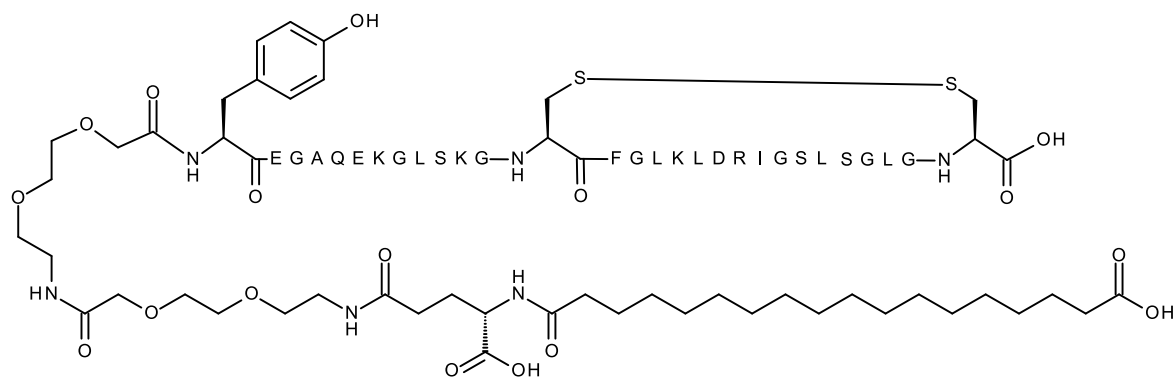
10

Peso molecular: 3,666.2651. LCMS34: m/3 calculado: 1,223.0884; m/3 encontrado: 1,222.9000; ;

Quím. 12; Compuesto ID 1223; SEQ ID NO: 12

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,701.266. LCMS34: m/3 calculado: 1,234.7553; m/3 encontrado: 1,234.5800; ;

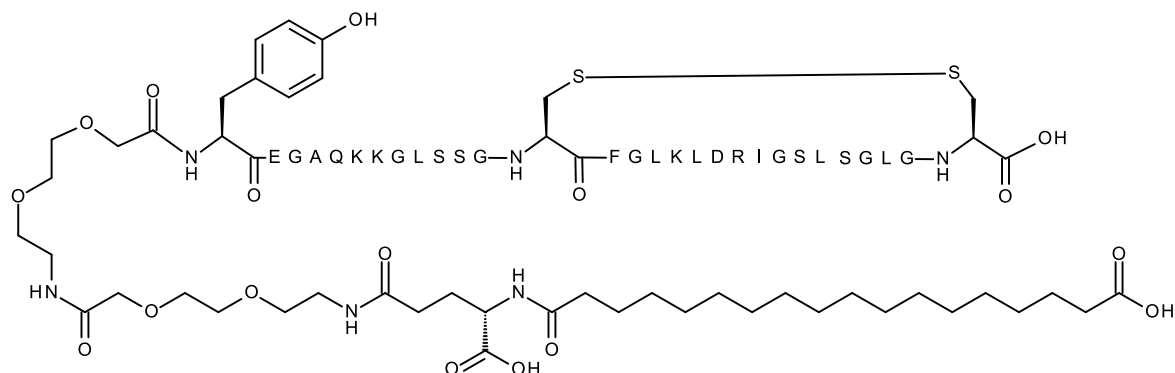
Quím. 13; Compuesto ID 1224; SEQ ID NO: 13

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 19S, 32L]-hCNP37

30

5



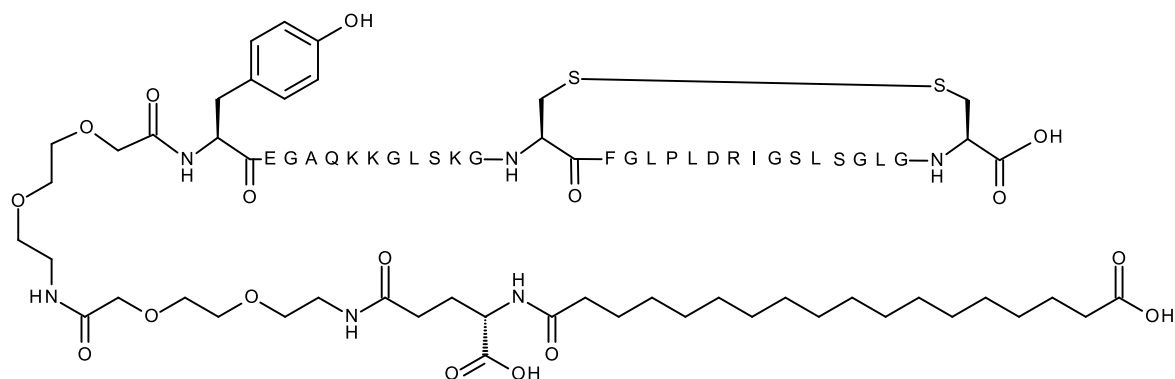
Peso molecular: 3,659.2294. LCMS34: m/3 calculado: 1,220.7431; m/3 encontrado: 1,220.3212;

10 m/4 calculado: 915.8074; m/4 encontrado: 915.7400

Quím. 14; Compuesto ID 1225; SEQ ID NO: 14

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

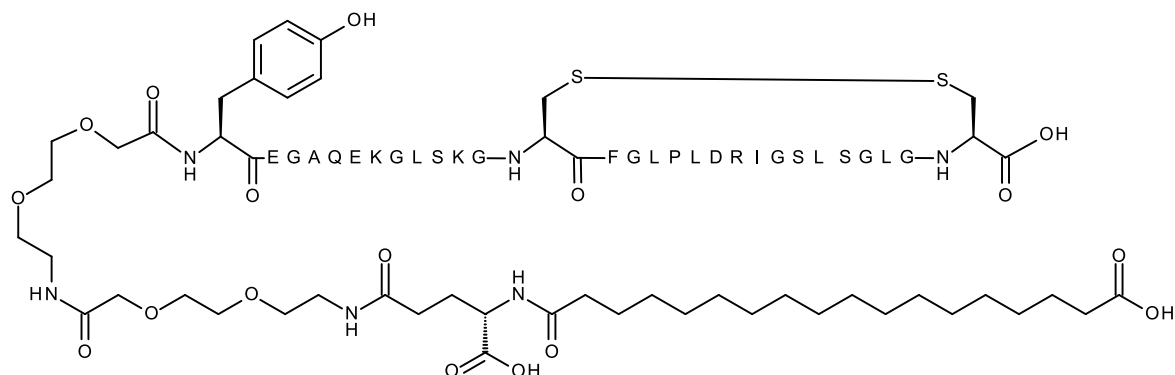
Peso molecular: 3,669.2672. UPLC107: m/3 calculado: 1,224.0891; m/3 encontrado: 1,223.9400

Quím. 15; Compuesto ID 1226; SEQ ID NO: 15

25 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 14E, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



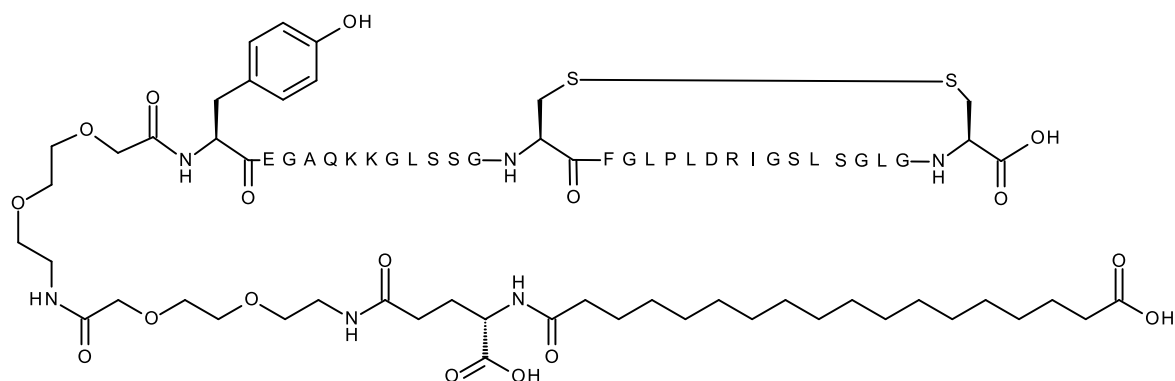
Peso molecular: 3,670.2089. UPLC107: m/3 calculado: 1,224.4030; m/3 encontrado: 1,224.2000

10

Quím. 16; Compuesto ID 1227; SEQ ID NO: 16

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,628.1723. LCMS34: m/3 calculado: 1,210.3908; m/3 encontrado: 1,210.4200; m/4 calculado: 908.0431; m/4 encontrado: 908.0900

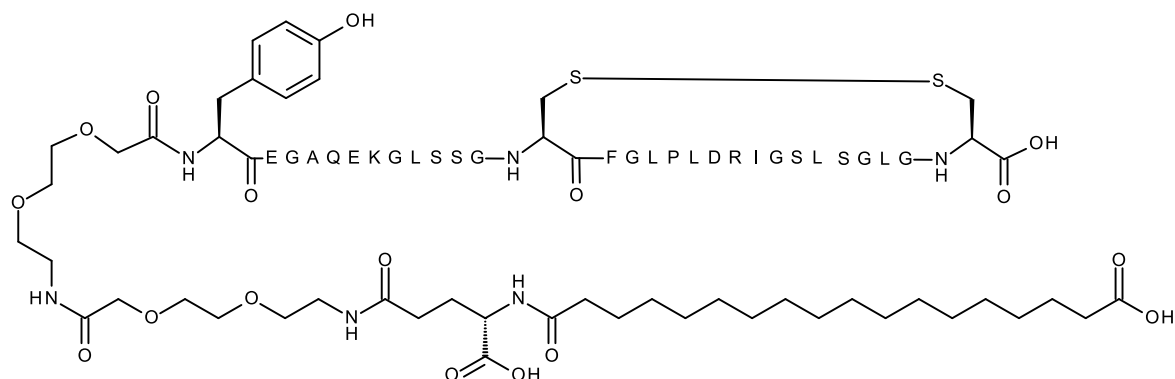
Quím. 17; Compuesto ID 1228; SEQ ID NO: 17

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



10

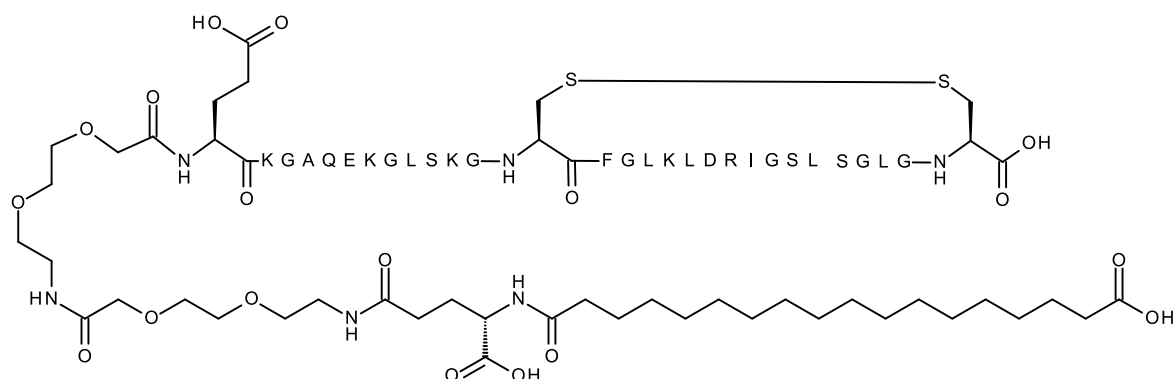
Peso molecular: 3,629.114. LCMS34: m/3 calculado: 1,210.7047; m/3 encontrado: 1,210.5790; m/4 calculado: 908.2785; m/4 encontrado: 908.1400

Quím. 18; Compuesto ID 1229; SEQ ID NO: 18

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

15

20



25

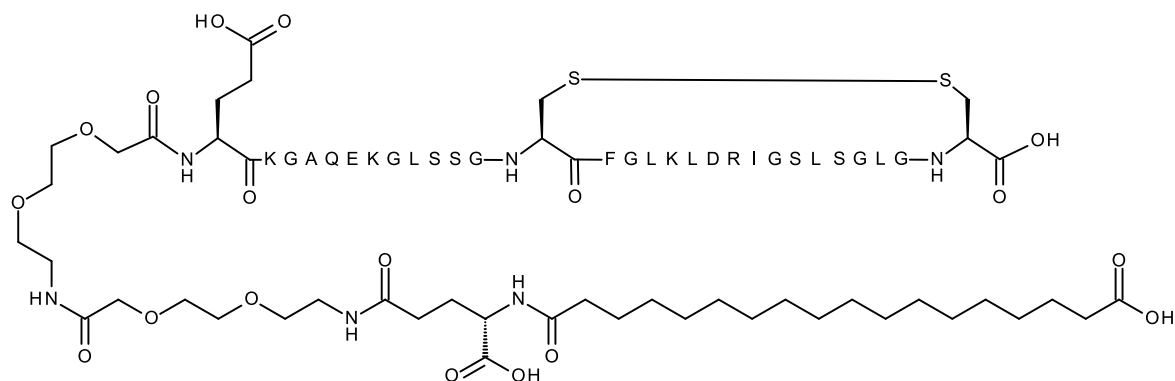
Peso molecular: 3,666.2651. UPLC107: m/3 calculado: 1,223.0884; m/3 encontrado: 1,222.9300

Quím. 19; Compuesto ID 1230; SEQ ID NO: 19

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 13Q, 14E, 19S, 32L]-hCNP37

30

5



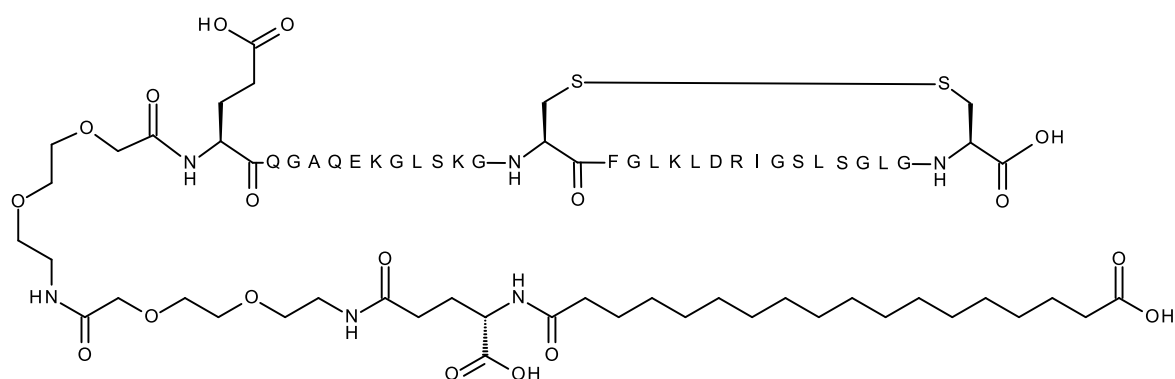
Peso molecular: 3,625.1701. UPLC107: m/3 calculado: 1,209.3900; m/3 encontrado: 1,209.2800

10

Quím. 20; Compuesto ID 1231; SEQ ID NO: 20

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10Q, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,666.222. UPLC107: m/3 calculado: 1,223.0740; m/3 encontrado: 1,222.9700

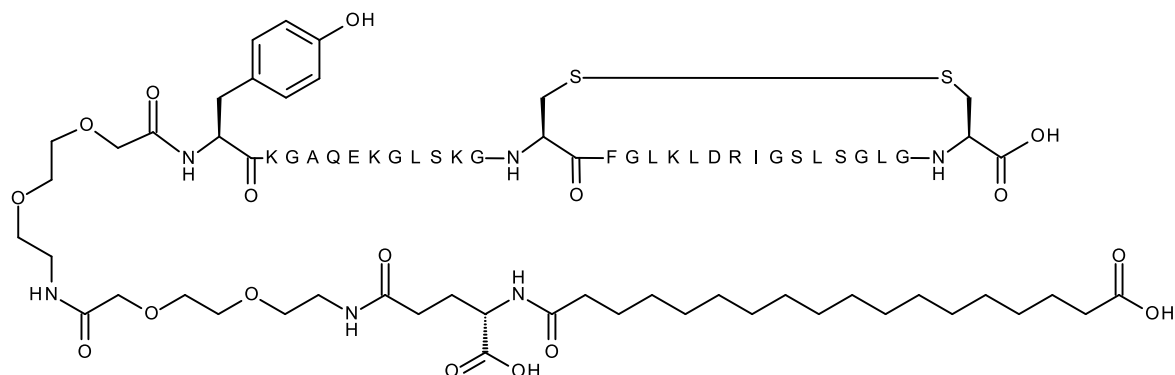
Quím. 21; Compuesto ID 1232; SEQ ID NO: 21

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

30

5



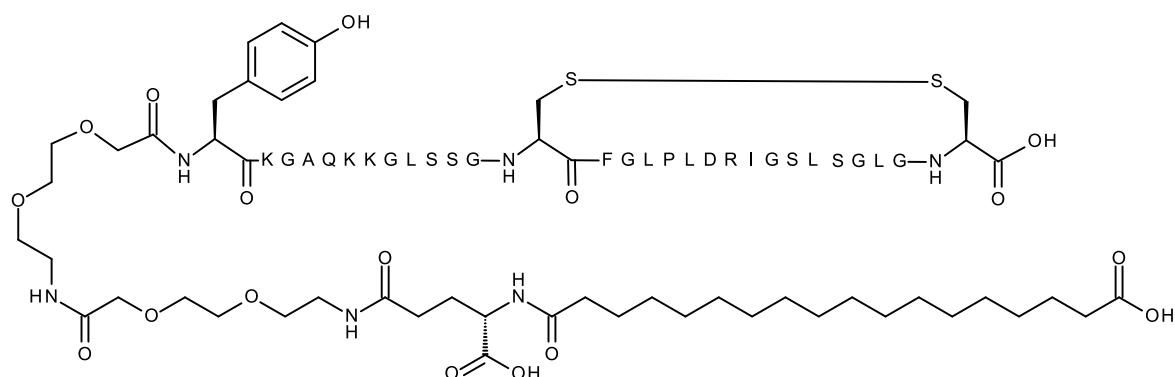
Peso molecular: 3,700.3243. UPLC107: m/3 calculado: 1,234.4414; m/3 encontrado: 1,234.2100

10

Quím. 22; Compuesto ID 1233; SEQ ID NO: 22

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,627.2306. UPLC107: m/3 calculado: 1,210.0769; m/3 encontrado: 1,209.9600

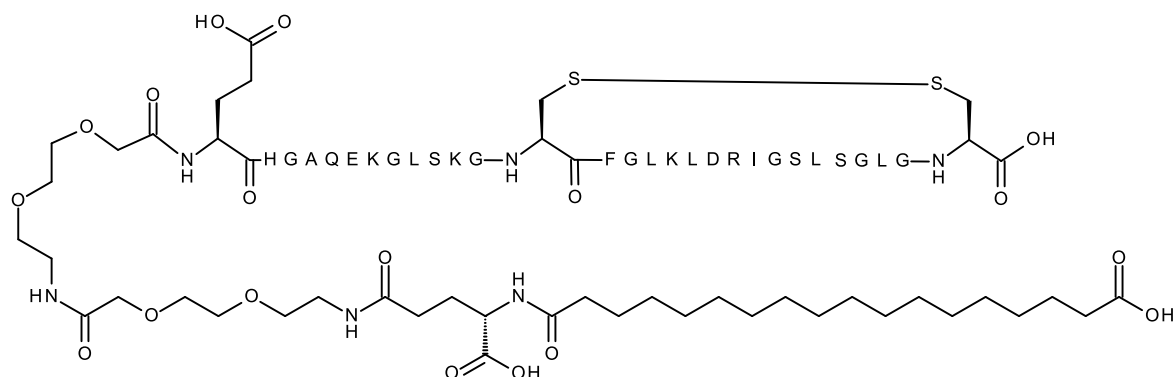
Quím. 23; Compuesto ID 1236; SEQ ID NO: 23

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

30

5



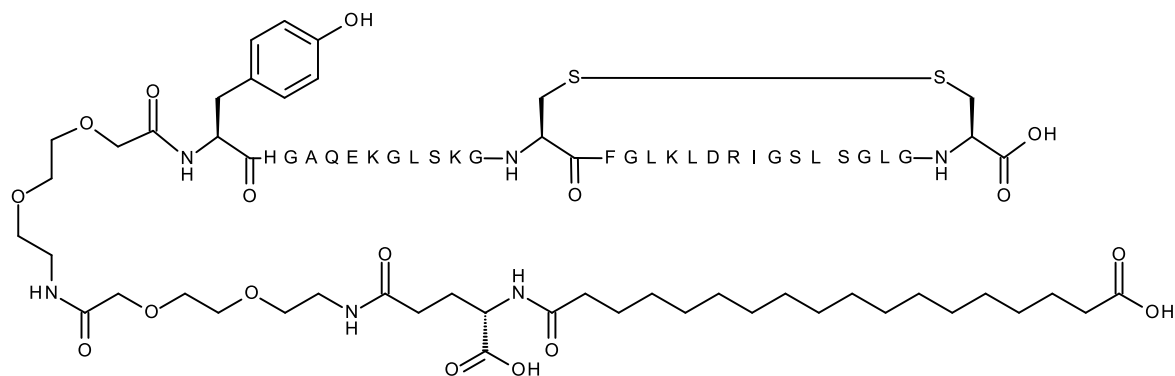
Peso molecular: 3,675.2321. LCMS34: m/3 calculado: 1,226.0774; m/3 encontrado: 1,225.8900; ;

10

Quím. 24; Compuesto ID 1237; SEQ ID NO: 24

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 14E, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,709.2913. UPLC107: m/3 calculado: 1,237.4304; m/3 encontrado: 1,237.3400

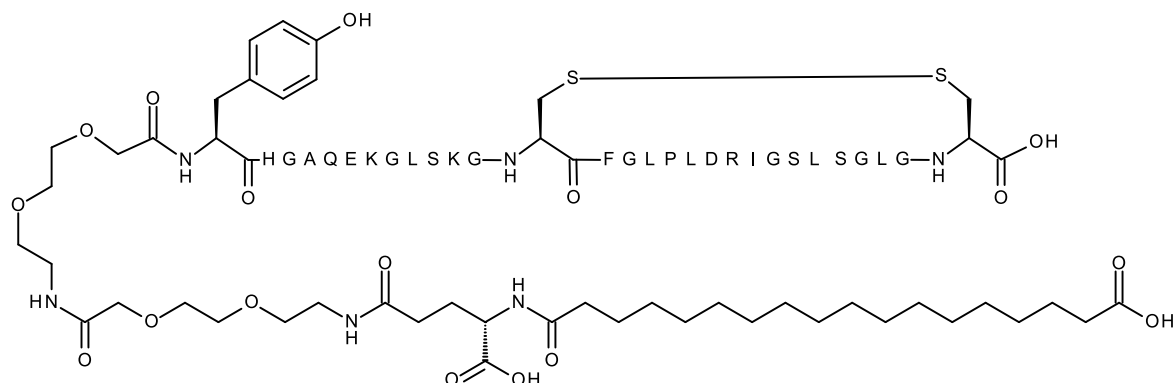
Quím. 25; Compuesto ID 1240; SEQ ID NO: 25

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 14E, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



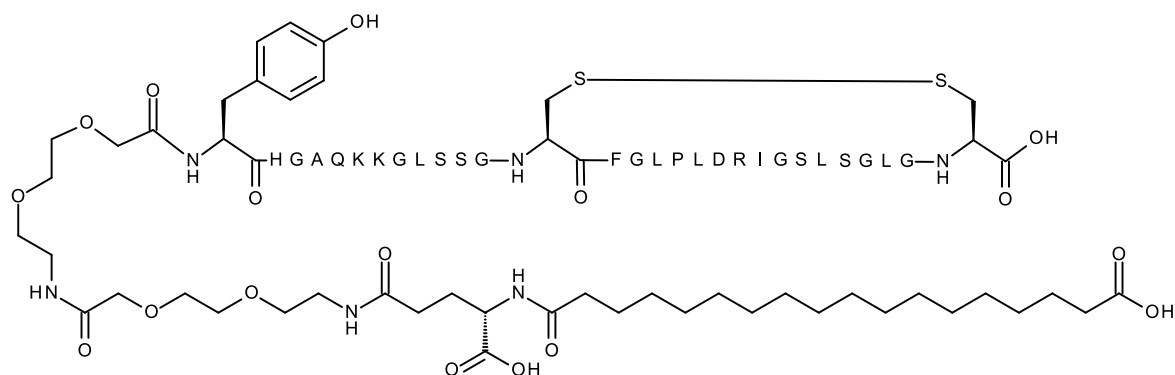
Peso molecular: 3,678.2342. UPLC107: m/3 calculado: 1,227.0781; m/3 encontrado: 1,226.9500

10

Quím. 26; Compuesto ID 1241; SEQ ID NO: 26

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,636.1976. LCMS34: m/3 calculado: 1,213.0659; m/3 encontrado: 1,213.1011; m/4 calculado: 910.0494; m/4 encontrado: 910.0900

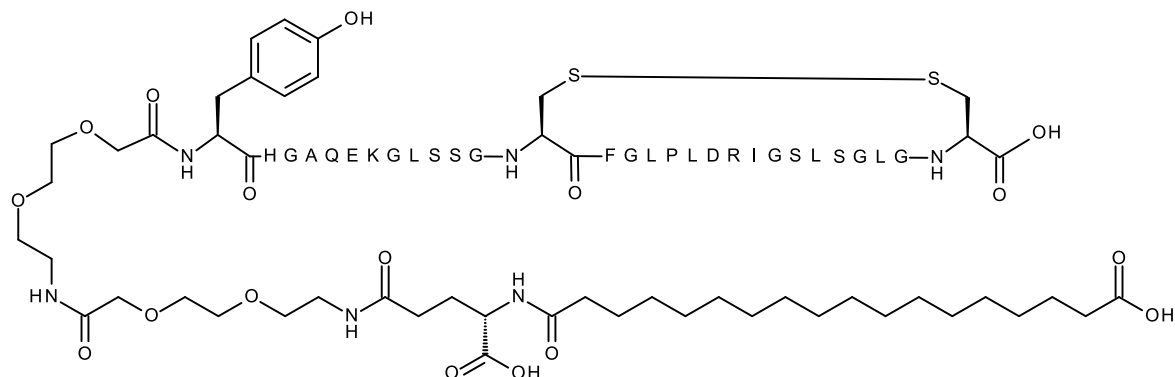
Quím. 27; Compuesto ID 1242; SEQ ID NO: 27

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



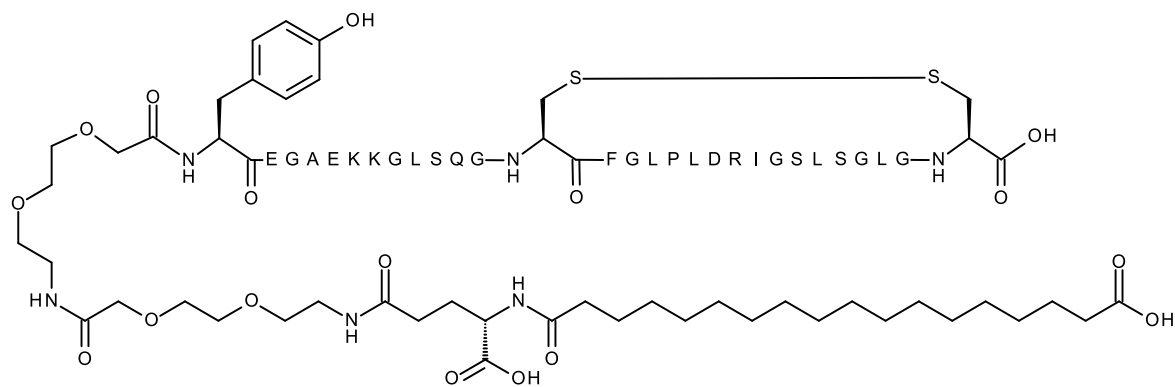
Peso molecular: 3,637.1393. UPLC107: m/3 calculado: 1,213.3798; m/3 encontrado: 1,213.2100

10

Quím. 28; Compuesto ID 1274; SEQ ID NO: 28

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13E, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,670.2089. LCMS34: m/3 calculado: 1,224.4030; m/3 encontrado: 1,224.3150; m/4 calculado: 918.5522; m/4 encontrado: 918.4840

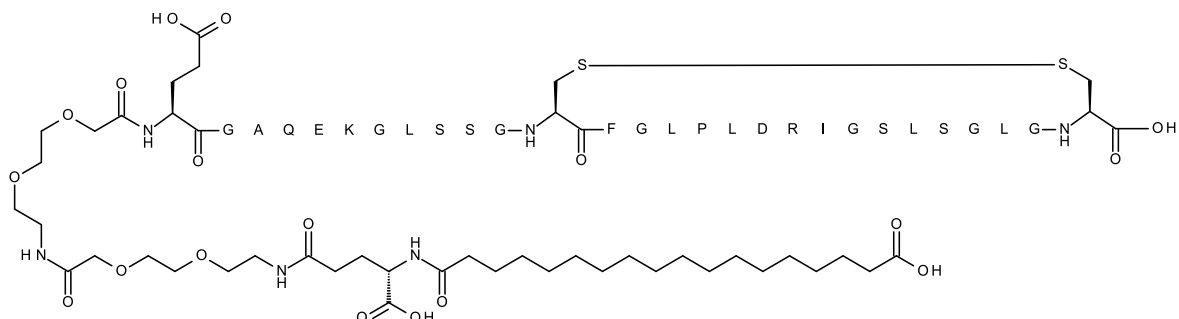
Quím. 29; Compuesto ID 1287; SEQ ID NO: 29

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-9, 10E, 13Q, 14E, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



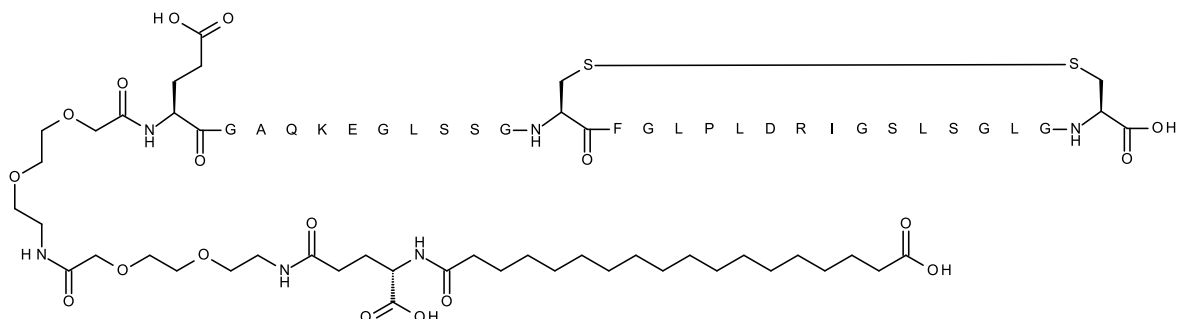
Peso molecular: 3,465.9407. LCMS34: m/3 calculado: 1,156.3136; m/3 encontrado: 1,156.5100;
m/4 calculado: 867.4852; m/4 encontrado: 867.3800

10

Quím. 30; Compuesto ID 1288; SEQ ID NO: 30

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-9, 10E, 13Q, 15E, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,465.9407. LCMS34: m/3 calculado: 1,156.3136; m/3 encontrado: 1,155.8400;
m/4 calculado: 867.4852; m/4 encontrado: 867.3800

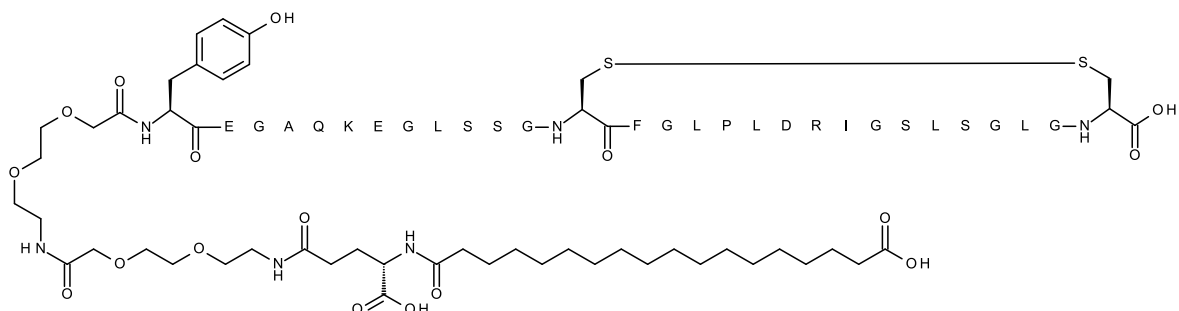
Quím. 31; Compuesto ID 1289; SEQ ID NO: 31

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 15E, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

25

30

5



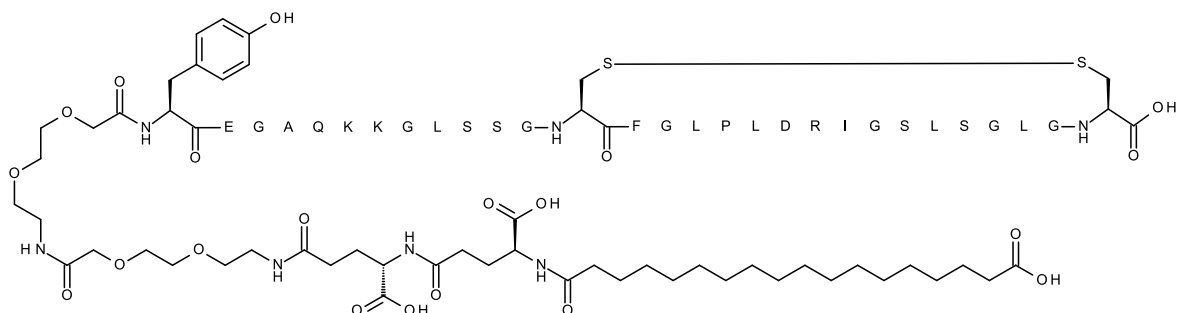
Peso molecular: 3,629.114. LCMS34: m/3 calculado: 1,210.7047; m/3 encontrado: 1,210.5500; m/4 calculado: 908.2785; m/4 encontrado: 908.1600

10

Quím. 32; Compuesto ID 1290; SEQ ID NO: 16

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



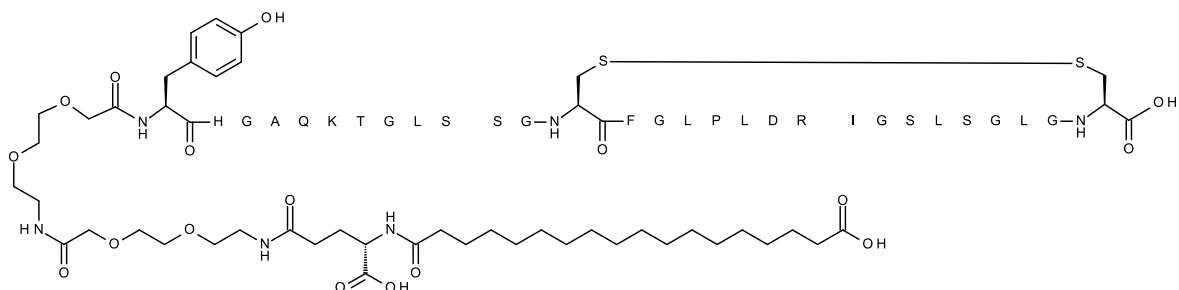
20

Peso molecular: 3,757.2862. LCMS34: m/3 calculado: 1,253.4287; m/3 encontrado: 1,253.5700; m/4 calculado: 940.3216; m/4 encontrado: 940.1700

Quím. 33; Compuesto ID 1302; SEQ ID NO: 32

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 15T, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

25



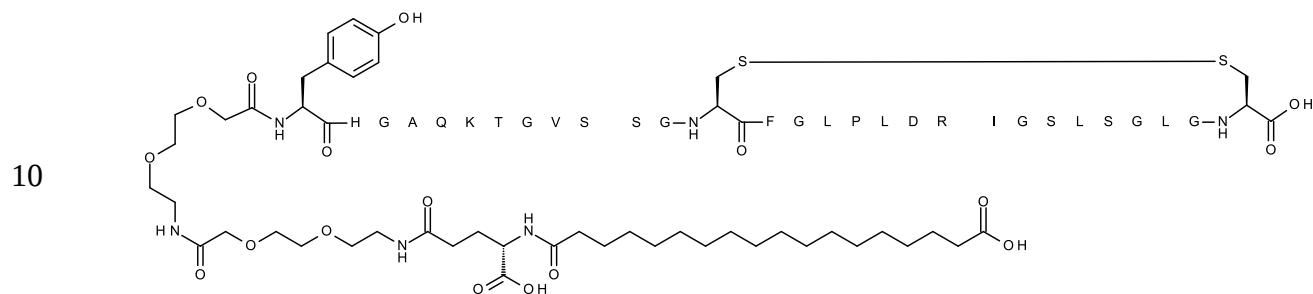
30

Peso molecular: 3,609.1292. LCMS34: m/3 calculado: 1,204.0431; m/3 encontrado: 1,203.7523;
m/4 calculado: 903.2823; m/4 encontrado: 903.3355

Quím. 34; Compuesto ID 1303; SEQ ID NO: 33

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

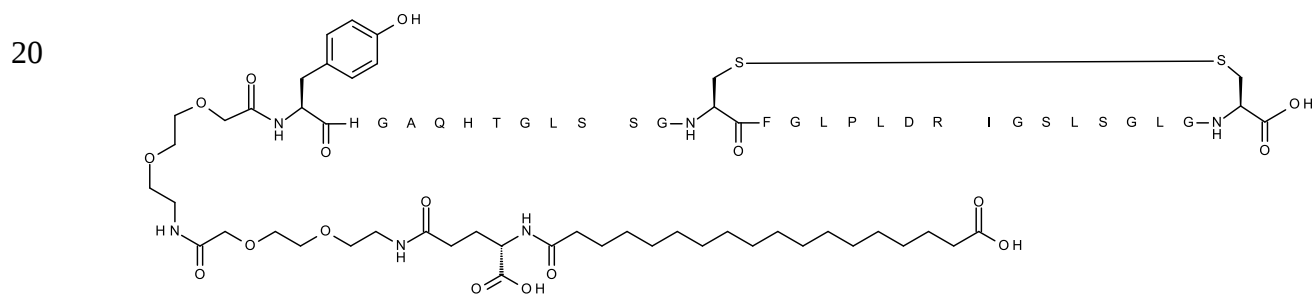


Peso molecular: 3,595.1026. LCMS34: m/3 calculado: 1,199.3675; m/3 encontrado: 1,199.3210;
m/4 calculado: 899.7757; m/4 encontrado: 899.7320

15 Quím. 35; Compuesto ID 1304; SEQ ID NO: 34

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
10H, 13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

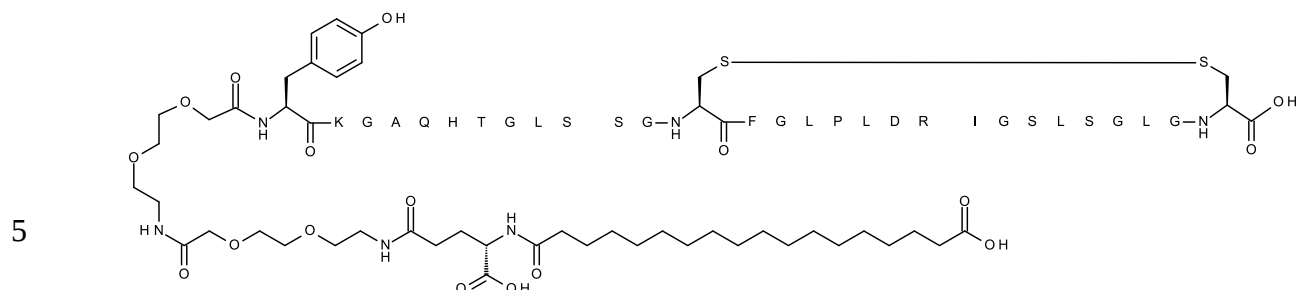


25 Peso molecular: 3,618.0962. LCMS34: m/3 calculado: 1,207.0321; m/3 encontrado: 1,206.7366;
m/4 calculado: 905.5241; m/4 encontrado: 905.5760

Quím. 36; Compuesto ID 1305; SEQ ID NO: 35

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

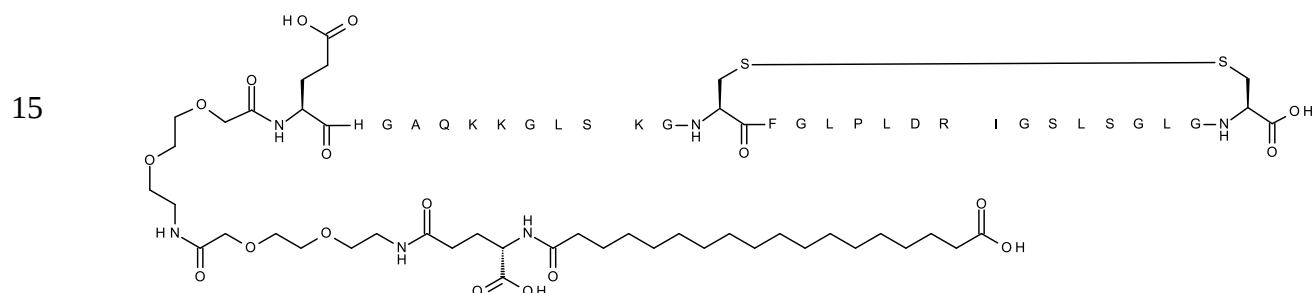
30 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 3,609.1292. LCMS34: m/3 calculado: 1,204.0431; m/3 encontrado: 1,204.0040;
m/4 calculado: 903.2823; m/4 encontrado: 903.2470

Quím. 37; Compuesto ID 1309; SEQ ID NO: 36

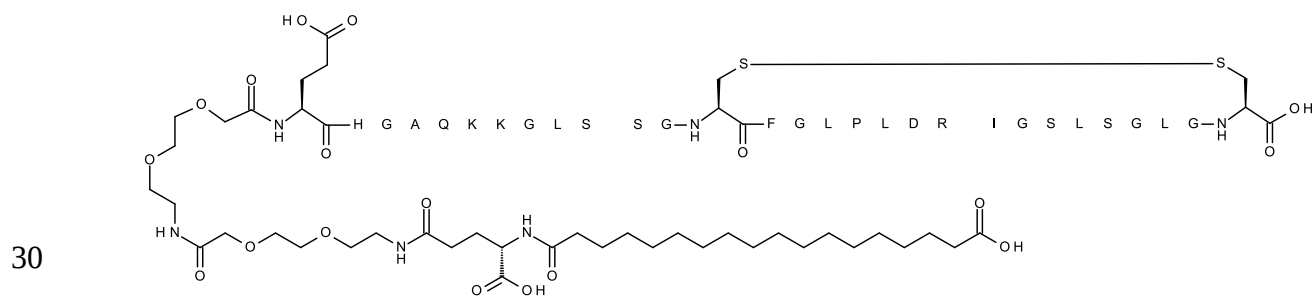
10 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 3,643.2333. LCMS34: m/3 calculado: 1,215.4111; m/3 encontrado: 1,215.4546;
m/4 calculado: 911.8083; m/4 encontrado: 911.8567

Quím. 38; Compuesto ID 1310; SEQ ID NO: 37

20 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

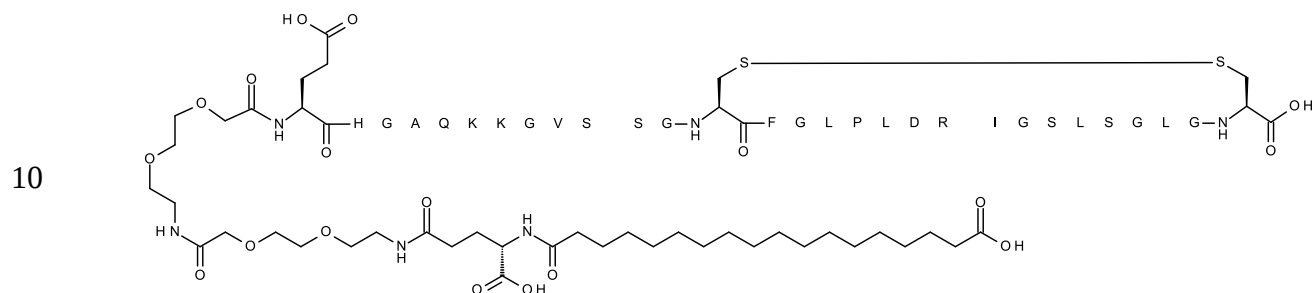


Peso molecular: 3,602.1383. LCMS34: m/3 calculado: 1,201.7128; m/3 encontrado: 1,201.7507;
m/4 calculado: 901.5346; m/4 encontrado: 901.5770

Quím. 39; Compuesto ID 1311; SEQ ID NO: 38

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
9E, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

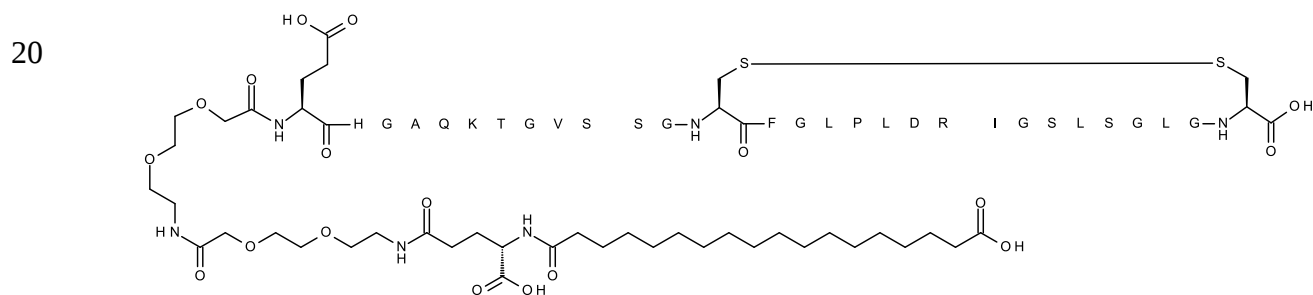


Peso molecular: 3,588.1117. LCMS34: m/3 calculado: 1,197.0372; m/3 encontrado: 1,197.0725;
m/4 calculado: 898.0279; m/4 encontrado: 898.0776

15 Quím. 40; Compuesto ID 1312; SEQ ID NO: 39

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
9E, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

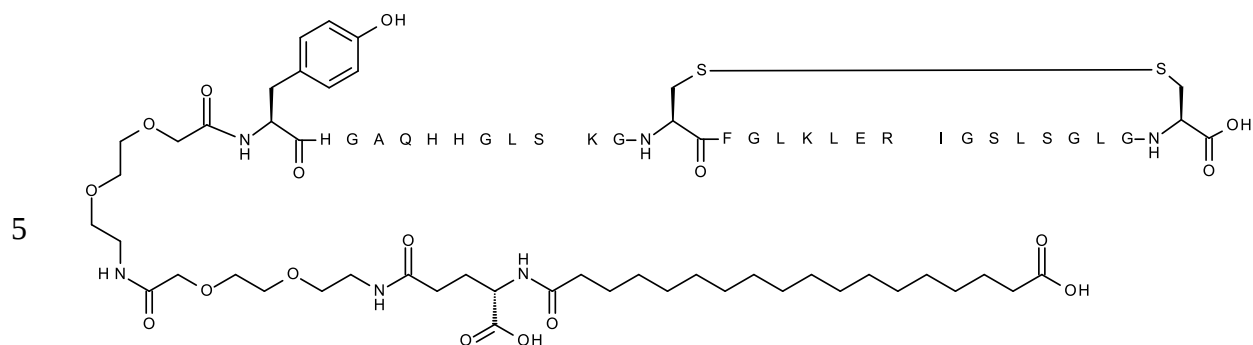


25 Peso molecular: 3,561.0433. LCMS34: m/3 calculado: 1,188.0144; m/3 encontrado: 1,187.9800;
m/4 calculado: 891.2608; m/4 encontrado: 891.2320

Quím. 41; Compuesto ID 1322; SEQ ID NO: 40

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

30 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
10H, 13Q, 14H, 15H, 27E, 32L]-hCNP37

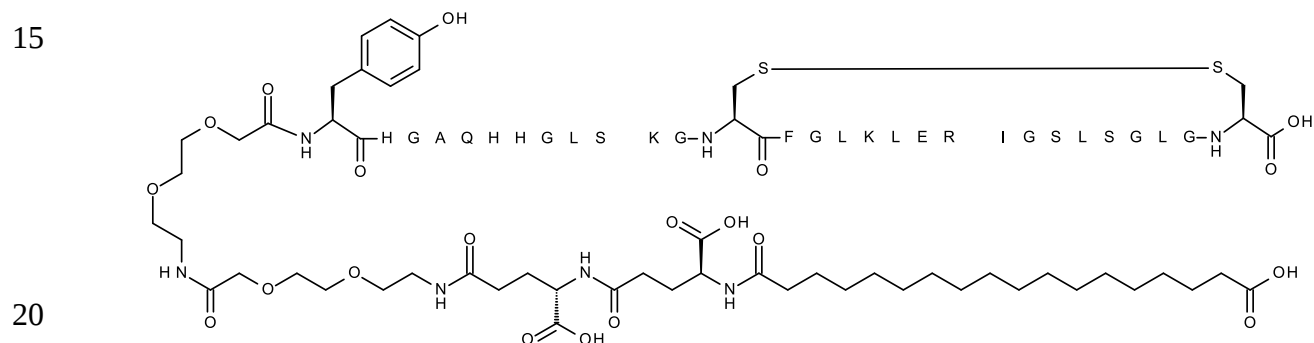


; Peso

molecular: 3,740.3102. LCMS34: m/3 calculado: 1,247.7701; m/3 encontrado: 1,247.6970; m/4 calculado: 936.0776; m/4 encontrado: 936.0280

Quím. 42; Compuesto ID 1323; SEQ ID NO: 40

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil)], des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 27E, 32L]-hCNP37

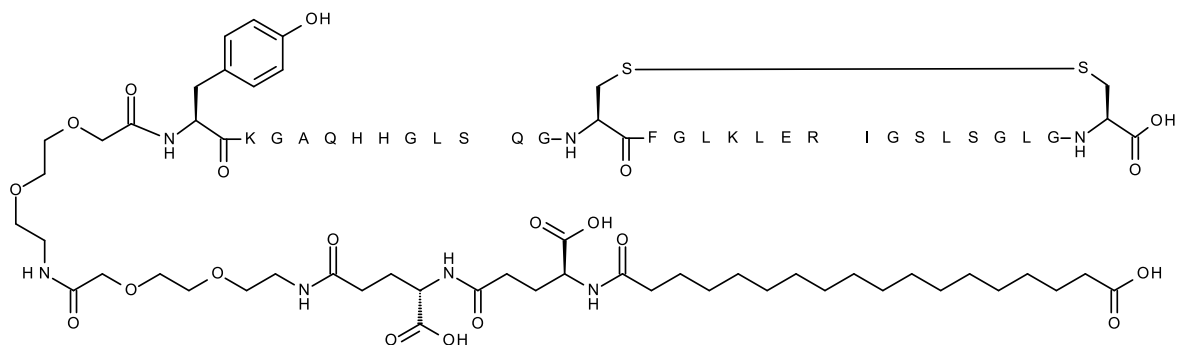


Peso molecular: 3,869.4242. LCMS34: m/3 calculado: 1,290.8081; m/3 encontrado: 1,290.7130; m/4 calculado: 968.3561; m/4 encontrado: 968.2840

Quím. 43; Compuesto ID 1324; SEQ ID NO: 41

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil)], des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 27E, 32L]-hCNP37

5



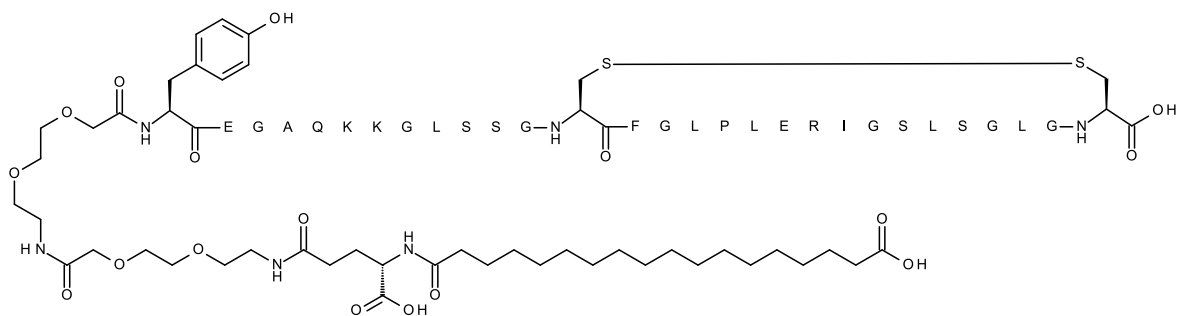
Peso molecular: 3,860.4141. LCMS34: m/3 calculado: 1,287.8047; m/3 encontrado: 1,287.7150;
m/4 calculado: 966.1035; m/4 encontrado: 966.0310

10

Quím. 44; Compuesto ID 1338; SEQ ID NO: 42

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,642.1988. LCMS34: m/3 calculado: 1,215.0663; m/3 encontrado: 1,214.9827;
m/4 calculado: 911.5497; m/4 encontrado: 911.2273

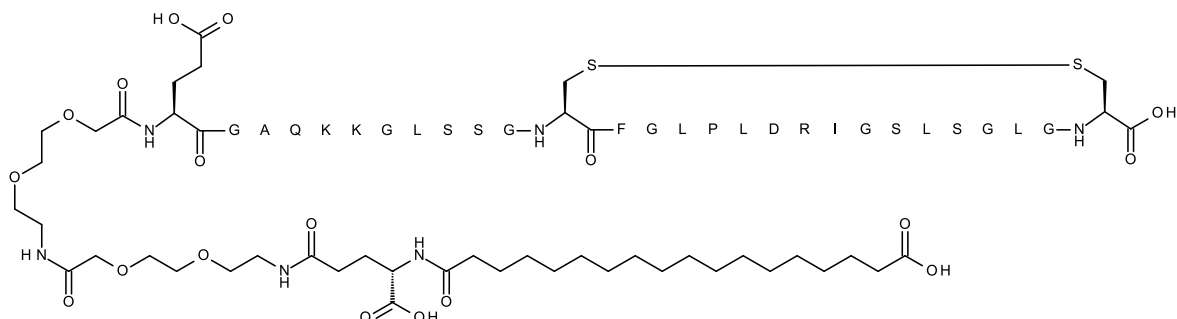
Quím. 45; Compuesto ID 1339; SEQ ID NO: 43

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-9, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

25

30

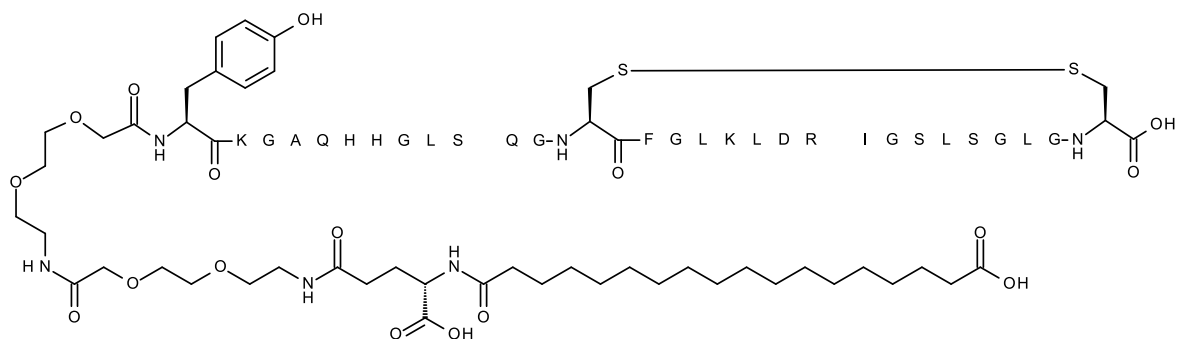
5



Peso molecular: 3,464.999. LCMS34: m/3 calculado: 1,155.9997; m/3 encontrado: 1,155.9600; m/4 calculado: 867.2498; m/4 encontrado: 866.9667

Quím. 46; Compuesto ID 1340; SEQ ID NO: 44
[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 32L]-hCNP37

15



20

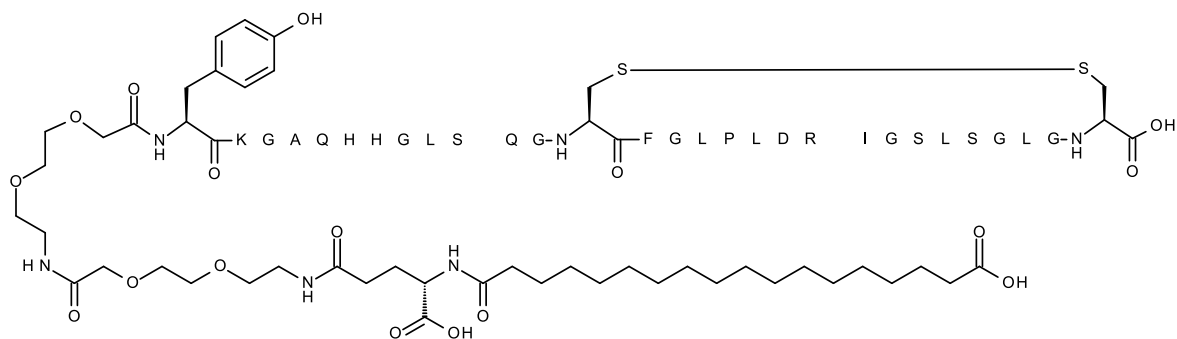
Peso molecular: 3,717.2736. LCMS34: m/3 calculado: 1,240.0912; m/3 encontrado: 1,240.0320; m/4 calculado: 930.3184; m/4 encontrado: 930.2630

Quím. 47; Compuesto ID 1341; SEQ ID NO: 45

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 14H, 15H, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



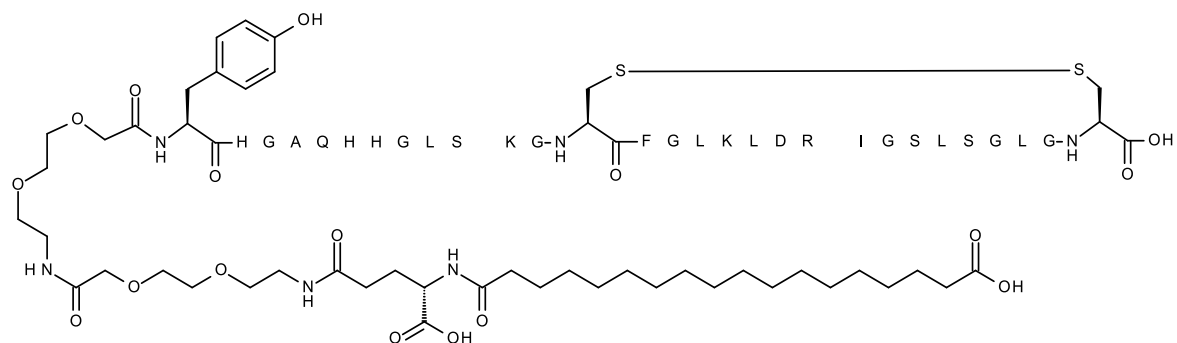
Peso molecular: 3,686.2165. LCMS34: m/3 calculado: 1,229.7388; m/3 encontrado: 1,229.6760;
m/4 calculado: 922.5541; m/4 encontrado: 922.5020

10

Quím. 48; Compuesto ID 1345; SEQ ID NO: 46

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,726.2836. LCMS34: m/3 calculado: 1,243.0945; m/3 encontrado: 1,243.0310;
m/4 calculado: 932.5709; m/4 encontrado: 932.5240

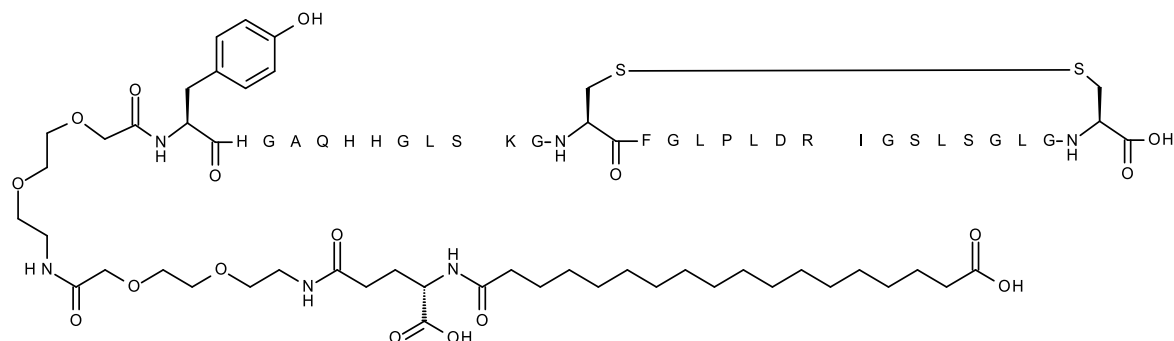
Quím. 49; Compuesto ID 1346; SEQ ID NO: 47

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 14H, 15H, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



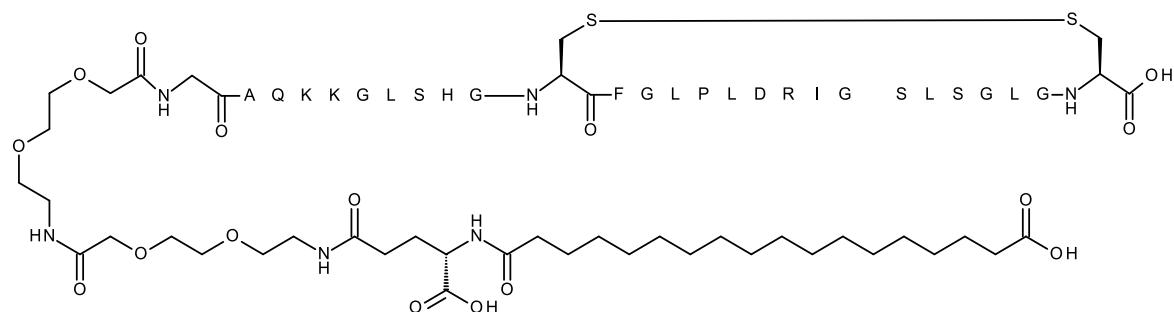
Peso molecular: 3,695.2265. LCMS34: m/3 calculado: 1,232.7422; m/3 encontrado: 1,232.6930;
m/4 calculado: 924.8066; m/4 encontrado: 924.7340

10

Quím. 50; Compuesto ID 1347; SEQ ID NO: 48

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-10, 13Q, 19H, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

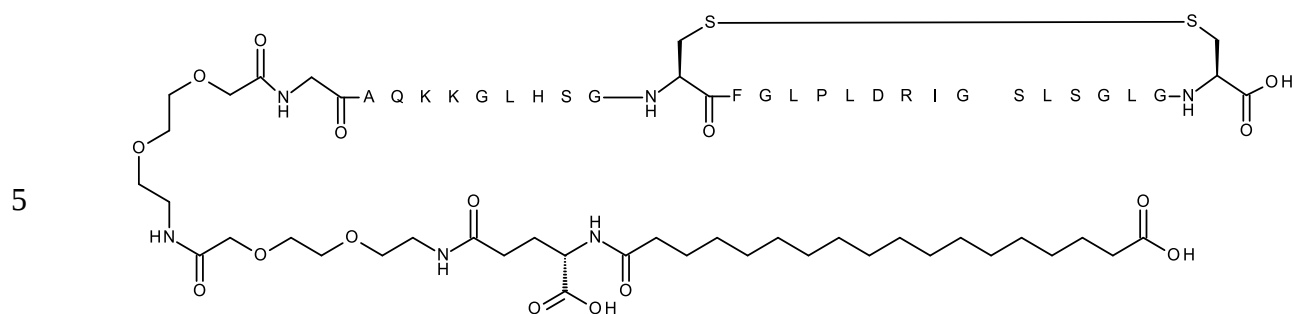
Peso molecular: 3,385.947. LCMS34: m/3 calculado: 1,129.6490; m/3 encontrado: 1,129.2775; m/4 calculado: 847.4868; m/4 encontrado: 847.2063

Quím. 51; Compuesto ID 1348; SEQ ID NO: 49

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-10, 13Q, 18H, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

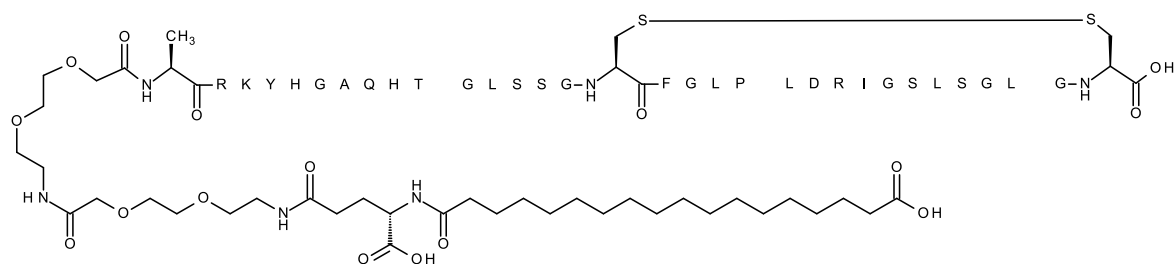
30



Peso molecular: 3,385.947. LCMS34: m/3 calculado: 1,129.6490; m/3 encontrado: 1,129.2775; m/4 calculado: 847.4868; m/4 encontrado: 847.4684

Quím. 52; Compuesto ID 1350; SEQ ID NO: 50

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

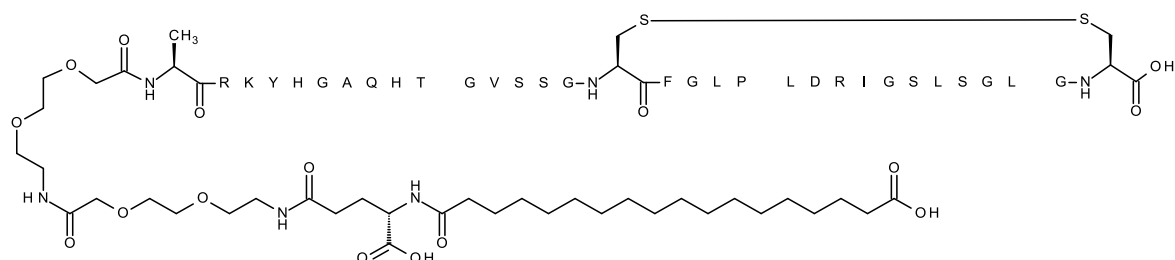


Peso molecular: 3,973.532. LCMS34: m/3 calculado: 1,325.5107; m/3 encontrado: 1,325.3463; m/4 calculado: 994.3830; m/4 encontrado: 994.2843

Quím. 53; Compuesto ID 1351; SEQ ID NO: 51

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

5



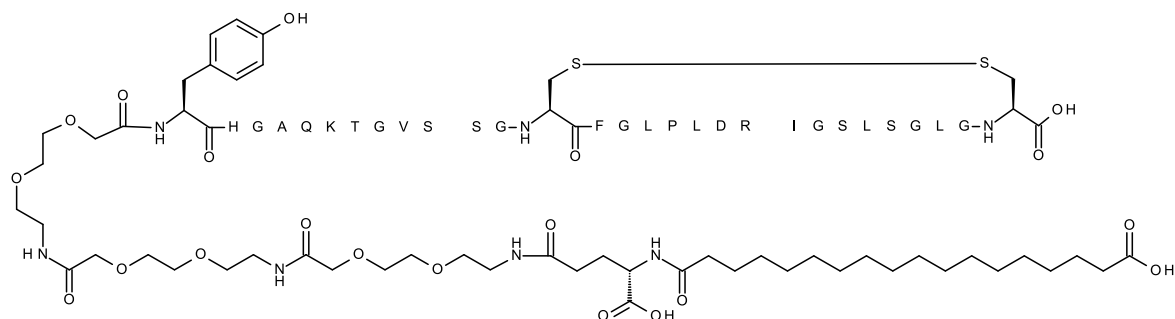
Peso molecular: 3,959.5054. LCMS34: m/3 calculado: 1,320.8351; m/3 encontrado: 1,320.6271; m/4 calculado: 990.8764; m/4 encontrado: 990.7383

10

Quím. 54; Compuesto ID 1352; SEQ ID NO: 33

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



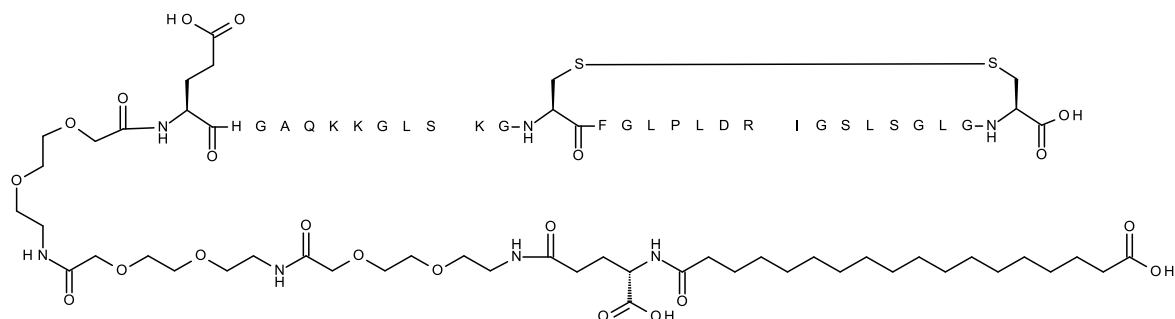
20

Peso molecular: 3,740.259. LCMS34: m/3 calculado: 1,247.7530; m/3 encontrado: 1,247.3048; m/4 calculado: 936.0648; m/4 encontrado: 935.9911

Quím. 55; Compuesto ID 1353; SEQ ID NO: 36

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

25



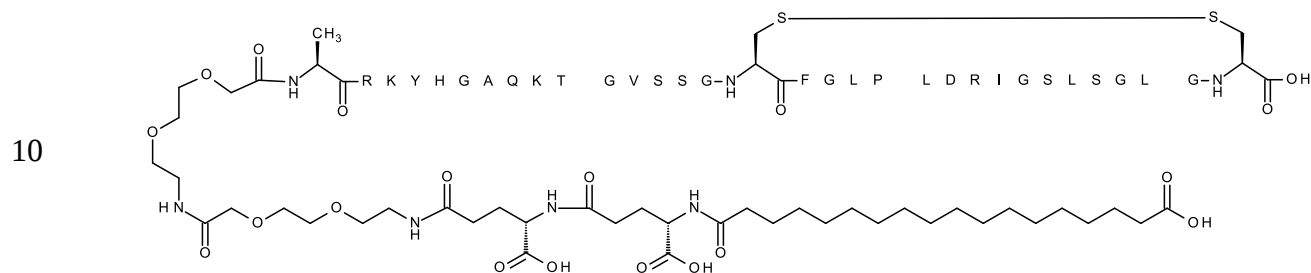
30

Peso molecular: 3,788.3897. LCMS34: m/3 calculado: 1,263.7966; m/3 encontrado: 1,263.6780; m/4 calculado: 948.0974; m/4 encontrado: 947.7735

Quím. 56; Compuesto ID 1354; SEQ ID NO: 52

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a
cetil)], des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

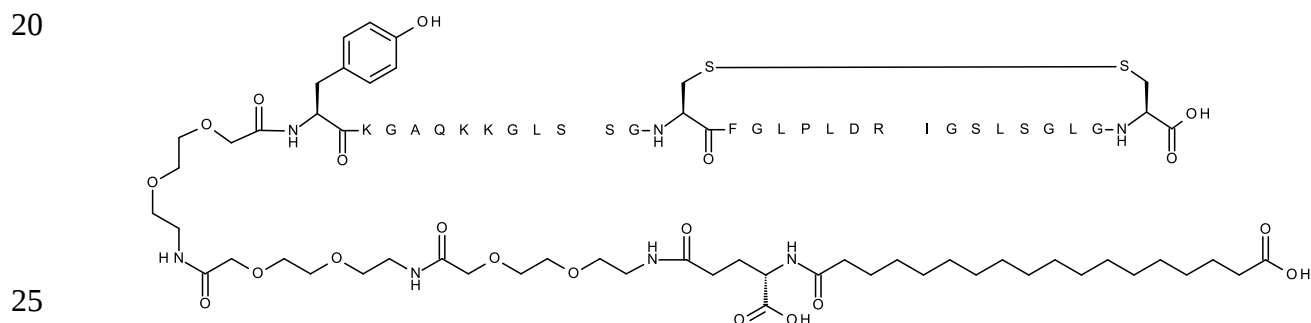


Peso molecular: 4,079.6524. LCMS34: m/3 calculado: 1,360.8841; m/3 encontrado: 1,360.7530; m/4 calculado: 1,020.9131; m/4 encontrado: 1,020.8160

Quím. 57; Compuesto ID 1355; SEQ ID NO: 22

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

15 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etox
i]etoxi]acetil)], des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

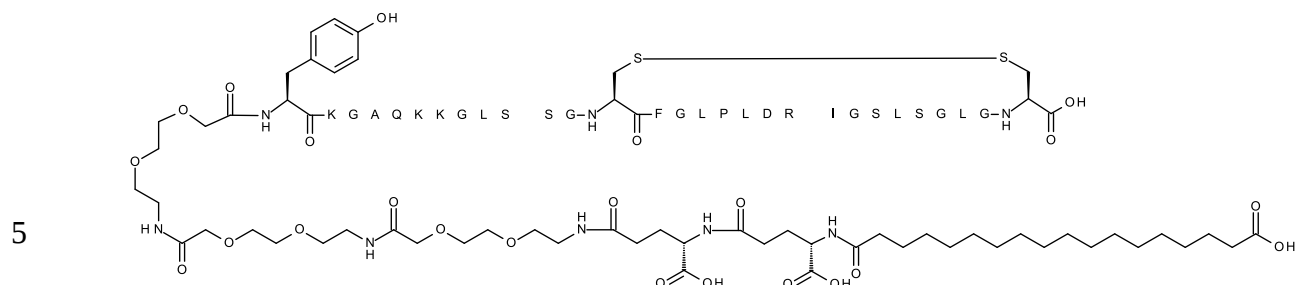


Peso molecular: 3,772.387. LCMS34: m/3 calculado: 1,258.4623; m/3 encontrado: 1,258.3439; m/4 calculado: 944.0968; m/4 encontrado: 944.0223

Quím. 58; Compuesto ID 1356; SEQ ID NO: 22

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

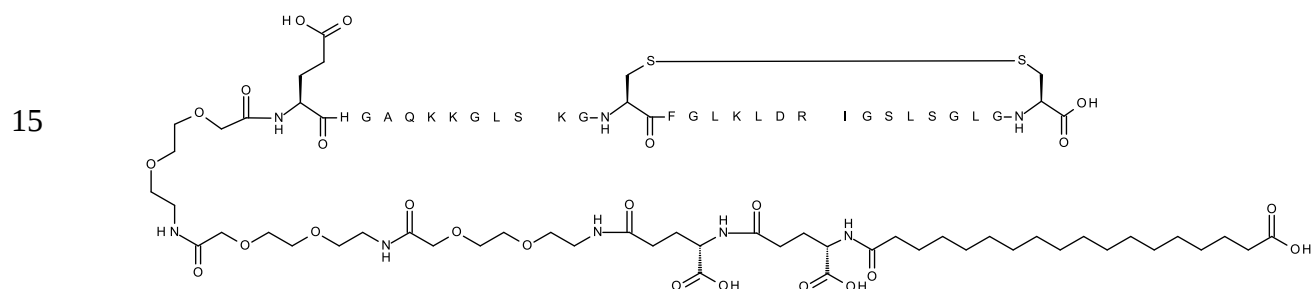
30 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a
cetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-8, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 3,901.501. LCMS34: m/3 calculado: 1,301.5003; m/3 encontrado: 1,301.3470; m/4 calculado: 976.3753; m/4 encontrado: 976.2725

Quím. 59; Compuesto ID 1357; SEQ ID NO: 5

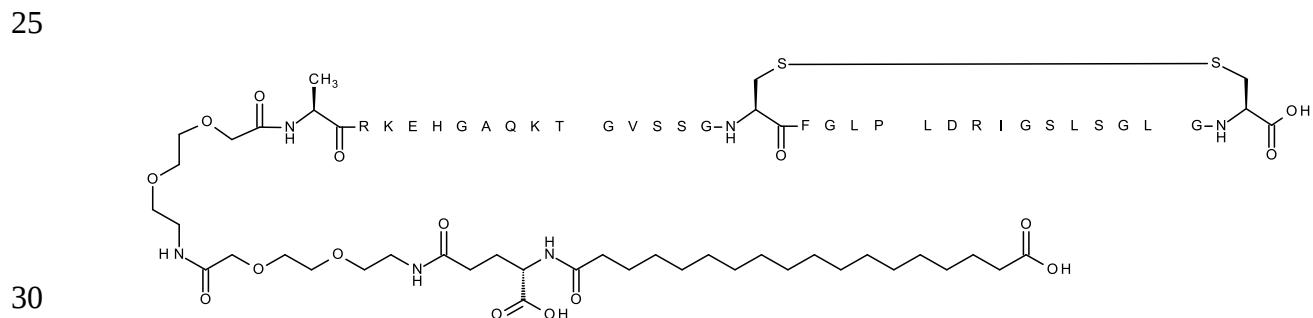
10 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 9E, 10H, 13Q, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 3,948.5608. LCMS34: m/3 calculado: 1,317.1869; m/3 encontrado: 1,317.0300; m/4 calculado: 988.1402; m/4 encontrado: 988.0348

Quím. 60; Compuesto ID 1359; SEQ ID NO: 53

20 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 9E, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

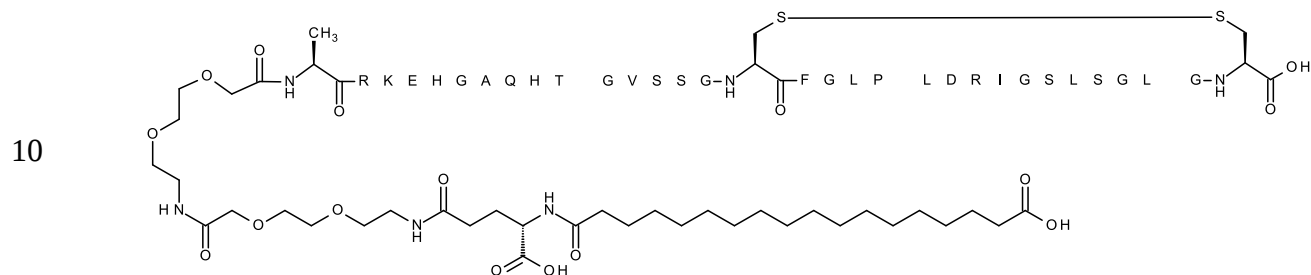


Peso molecular: 3,916.4792. LCMS34: m/3 calculado: 1,306.4931; m/3 encontrado: 1,306.0170;
m/4 calculado: 980.1198; m/4 encontrado: 979.7797

Quím. 61; Compuesto ID 1360; SEQ ID NO: 54

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5,
9E, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

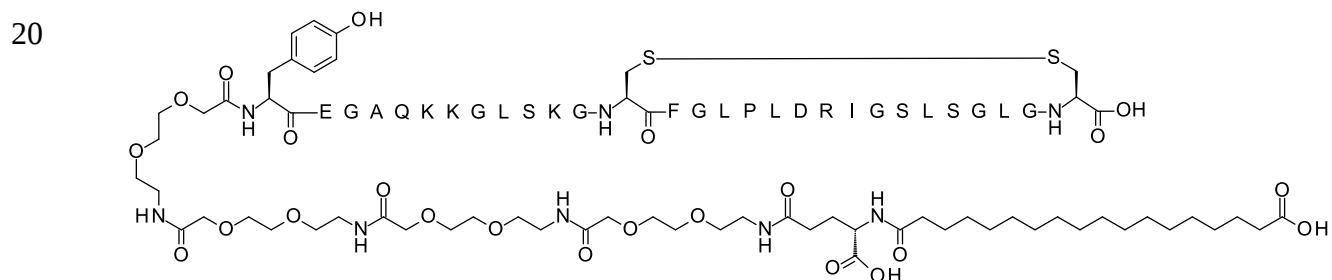


Peso molecular: 3,925.4462. LCMS34: m/3 calculado: 1,309.4821; m/3 encontrado: 1,309.3323;
m/4 calculado: 982.3616; m/4 encontrado: 982.2667

Quím. 62; Compuesto ID 1375; SEQ ID NO: 14

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi
i]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37



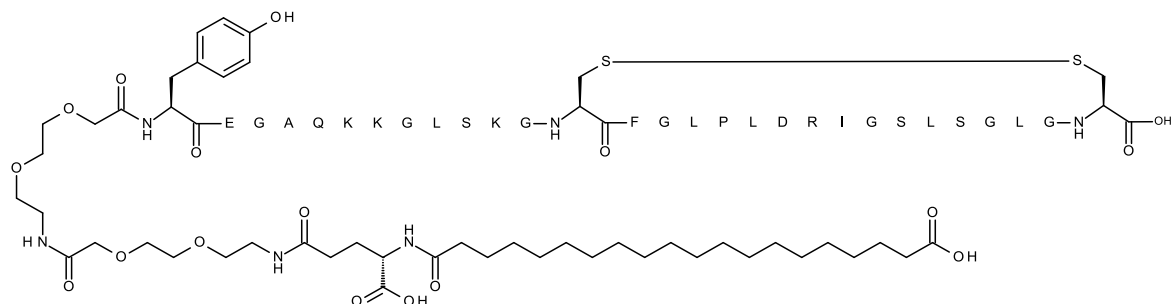
Peso molecular: 3,959.5801. LCMS34: m/3 calculado: 1,320.8600; m/3 encontrado: 1,320.7200;
m/4 calculado: 990.8950; m/4 encontrado: 990.5400

Quím. 63; Compuesto ID 1376; SEQ ID NO: 14

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(19-

carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8,
10E, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

5



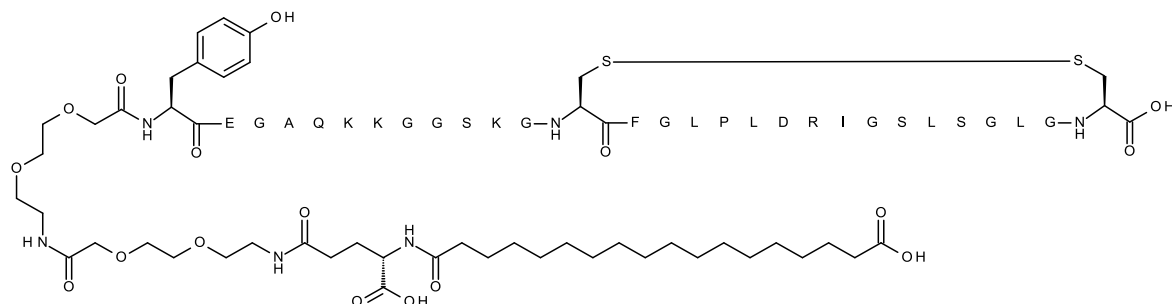
Peso molecular: 3,697.3204. LCMS34: m/3 calculado: 1,233.4401; m/3 encontrado: 1,233.3500;
m/4 calculado: 925.3301; m/4 encontrado: 925.2600

10

Quím. 64; Compuesto ID 1377; SEQ ID NO: 55

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 17G, 25P, 32L]-hCNP37

15



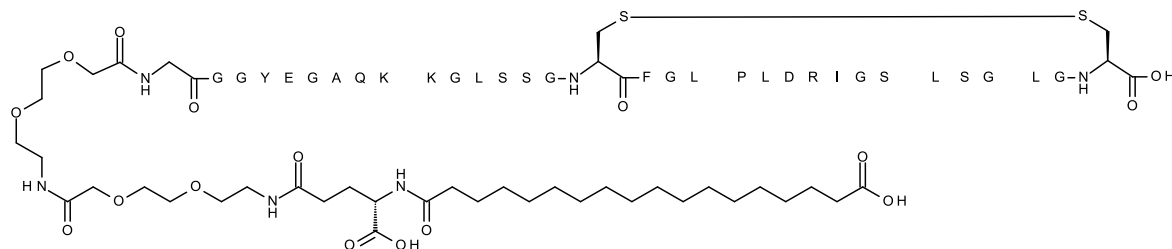
20

Peso molecular: 3,613.1609. LCMS34: m/3 calculado: 1,205.3870; m/3 encontrado: 1,205.3100;
m/4 calculado: 904.2902; m/4 encontrado: 903.9800

Quím. 65; Compuesto ID 1378; SEQ ID NO: 56

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 6G, 7G, 8G, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

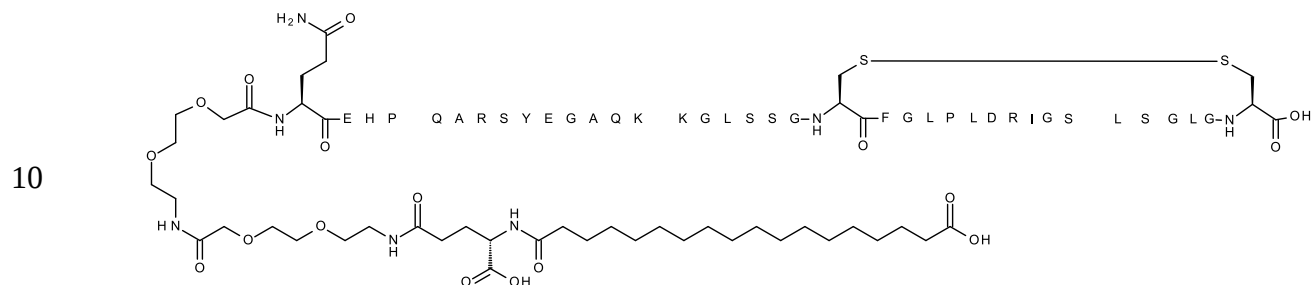


Peso molecular: 3,799.3262. LCMS34: m/3 calculado: 1,267.4421; m/3 encontrado: 1,267.3470; m/4 calculado: 950.8316; m/4 encontrado: 950.7240

Quím. 66; Compuesto ID 1379; SEQ ID NO: 57

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 8S, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

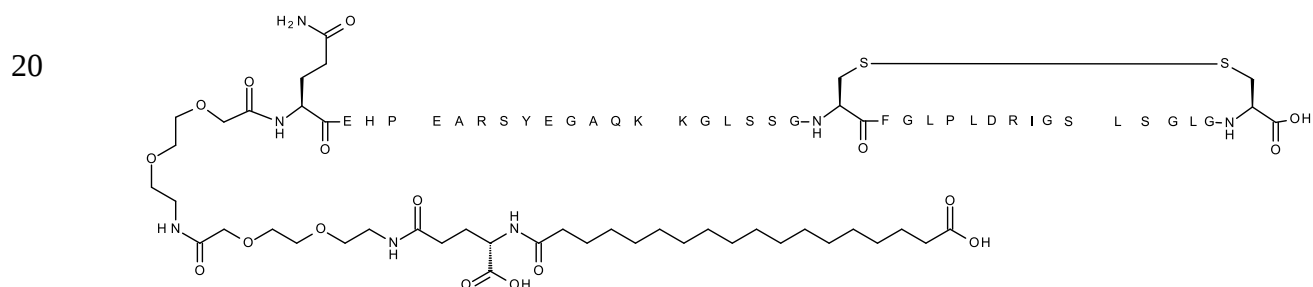


Peso molecular: 4,562.14. LCMS34: m/3 calculado: 1,521.7133; m/3 encontrado: 1,521.3220; m/4 calculado: 1,141.5350; m/4 encontrado: 1,141.2370

15 Quím. 67; Compuesto ID 1380; SEQ ID NO: 58

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5E, 8S, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



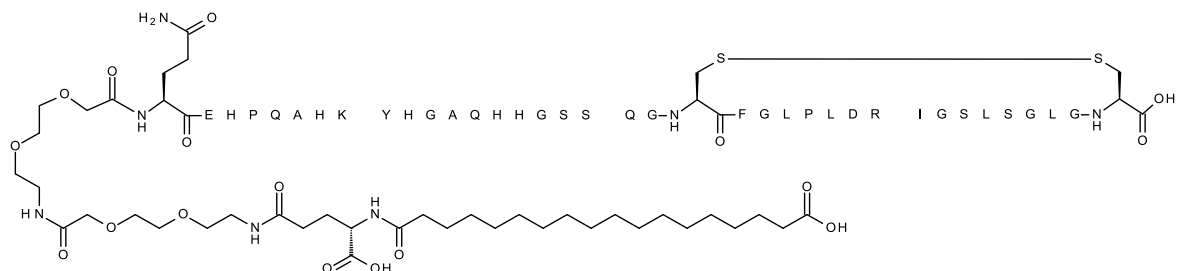
25 Peso molecular: 4,563.1248. LCMS34: m/3 calculado: 1,522.0416; m/3 encontrado: 1,521.8490; m/4 calculado: 1,141.7812; m/4 encontrado: 1,141.6240

Quím. 68; Compuesto ID 1381; SEQ ID NO: 59

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

30 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 7H, 10H, 13Q, 14H, 15H, 17S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

5



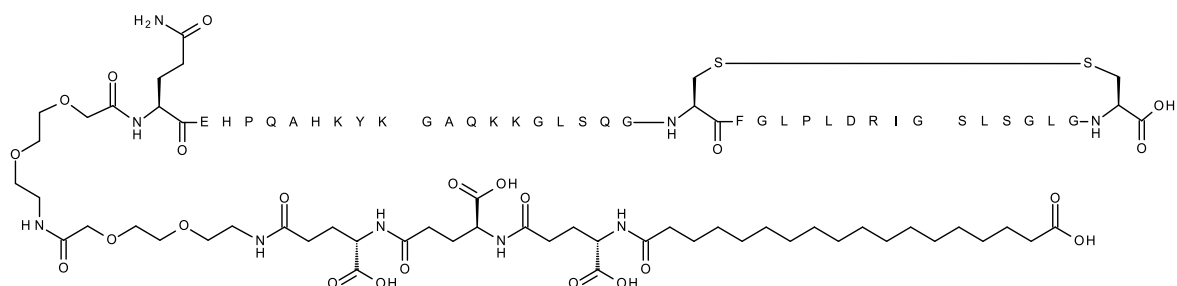
Peso molecular: 4,625.1195. LCMS34: m/3 calculado: 1,542.7065; m/3 encontrado: 1,542.3070;
m/4 calculado: 1,157.2799; m/4 encontrado: 1,156.9700

Quím. 69; Compuesto ID 1382; SEQ ID NO: 60

10

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], 5Q, 7H, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

15

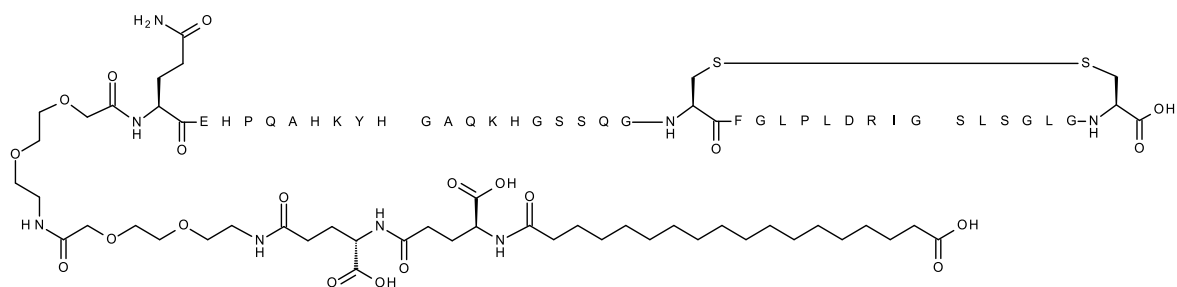


Peso molecular: 4,882.5268. LCMS34: m/3 calculado: 1,628.5089; m/3 encontrado: 1,628.2280;
m/4 calculado: 1,221.6317; m/4 encontrado: 1,221.2810

Quím. 70; Compuesto ID 1383; SEQ ID NO: 61

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a cetil)], 5Q, 7H, 10H, 13Q, 15H, 17S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

25



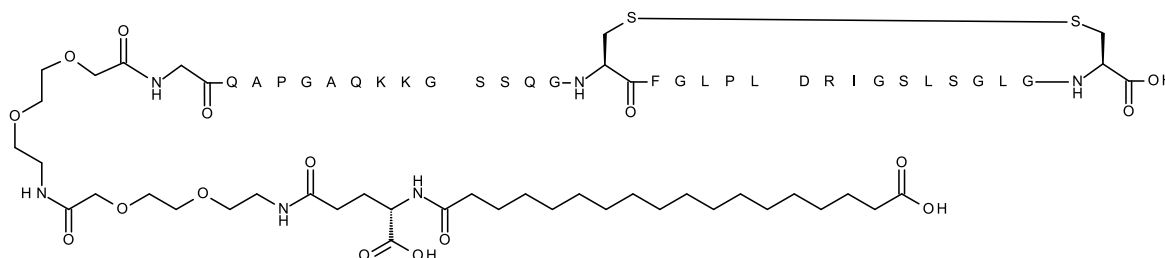
30

Peso molecular: 4,745.2665. LCMS34: m/3 calculado: 1,582.7555; m/3 encontrado: 1,582.5080;
m/4 calculado: 1,187.3166; m/4 encontrado: 1,186.9970

Quím. 71; Compuesto ID 9384; SEQ ID NO: 62

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-6, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

5



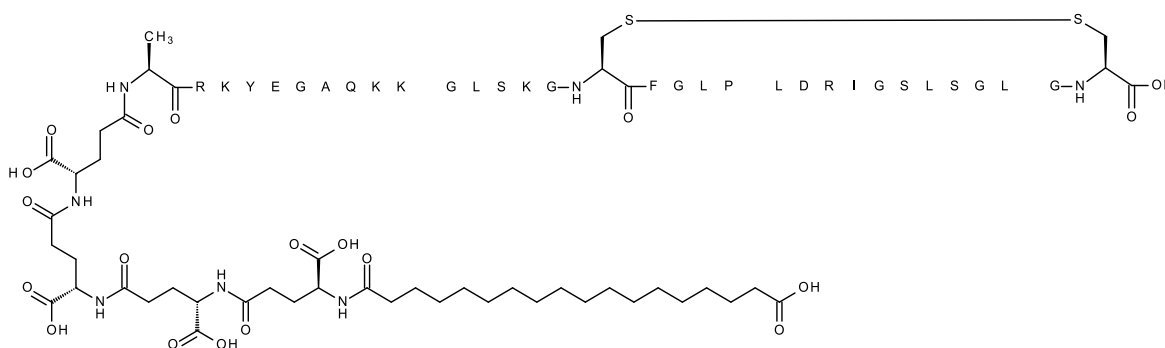
10

Peso molecular: 3,704.2302. LCMS34: m/3 calculado: 1,235.7434; m/3 encontrado: 1,235.5400; m/4 calculado: 927.0576; m/4 encontrado: 926.9010

Quím. 72; Compuesto ID 1385; SEQ ID NO: 63

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)), des1-5, 10E, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

20



25

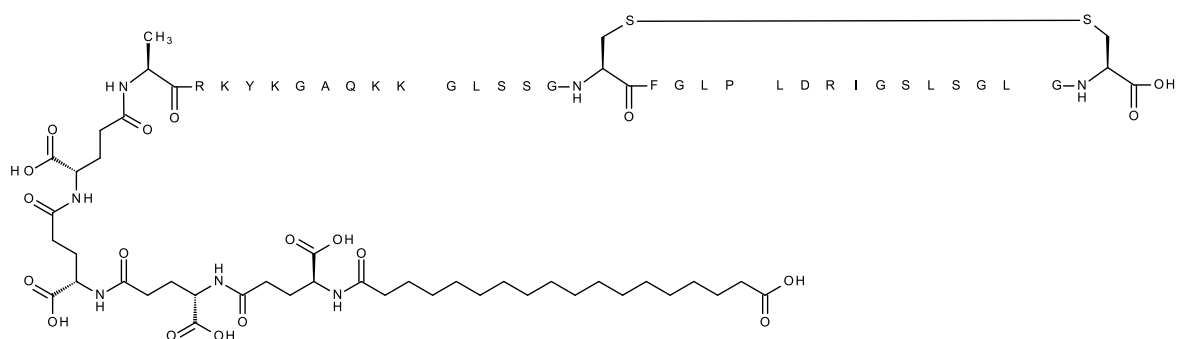
Peso molecular: 4,121.7322. LCMS34: m/3 calculado: 1,374.9107; m/3 encontrado: 1,374.6120; m/4 calculado: 1031,4331; m/4 encontrado: 1,031.2130

Quím. 73; Compuesto ID 1386; SEQ ID NO: 64

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)), des1-5, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



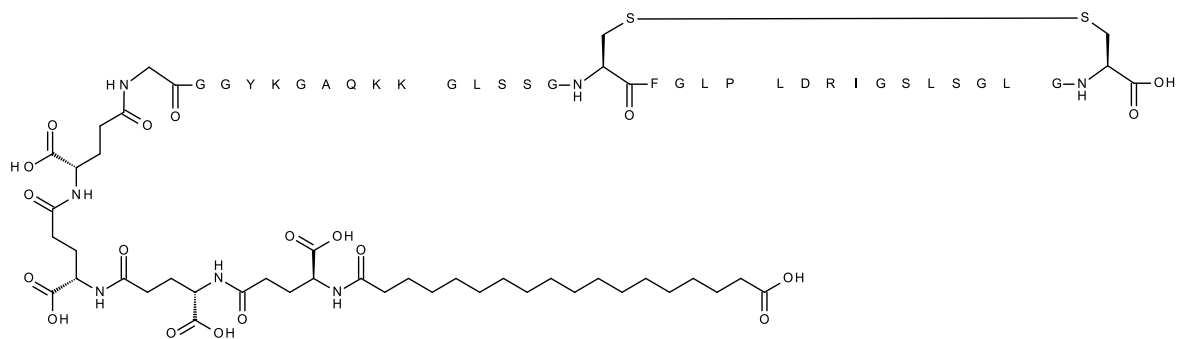
10

Peso molecular: 4,079.6955. LCMS34: m/3 calculado: 1,360.8985; m/3 encontrado: 1,360.7680;
m/4 calculado: 1,020.9239; m/4 encontrado: 1,020.8160

Quím. 74; Compuesto ID 1387; SEQ ID NO: 65

[N-terminal(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil)amino)butanoil)amino)butanoil)amino)butanoil)], des1-5, 6G, 7G, 8G, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 3,895.4136. LCMS34: m/3 calculado: 1,299.4712; m/3 encontrado: 1,299.3300;
m/4 calculado: 974.8534; m/4 encontrado: 974.7500

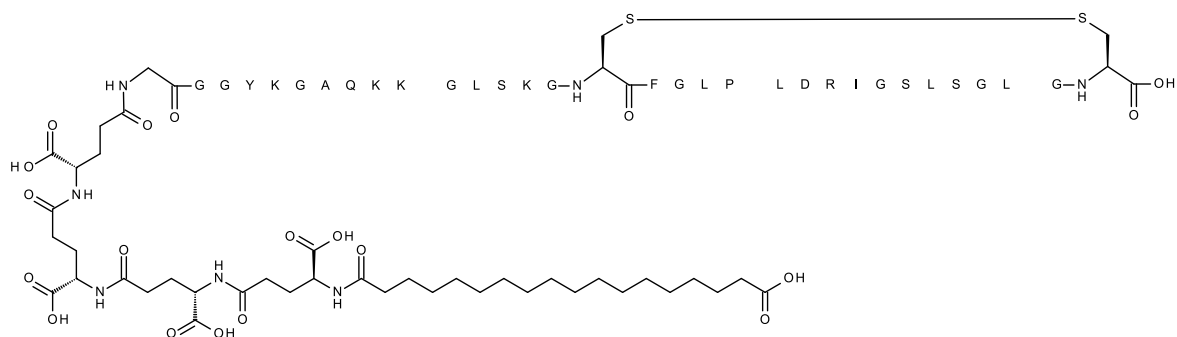
25

Quím. 75; Compuesto ID 1388; SEQ ID NO: 66

[N-terminal(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(((4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil)amino)butanoil)amino)butanoil)amino)butanoil)], des1-5, 6G, 7G, 8G, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



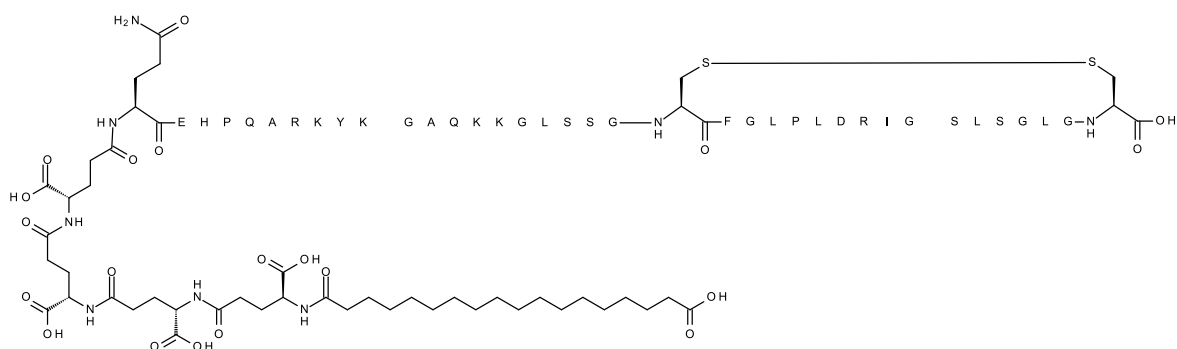
10

Peso molecular: 3,936.5086. LCMS34: m/3 calculado: 1,313.1695; m/3 encontrado: 1,313.0250;
m/4 calculado: 985.1272; m/4 encontrado: 985.2870

Quím. 76; Compuesto ID 1389; SEQ ID NO: 67

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)], 5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

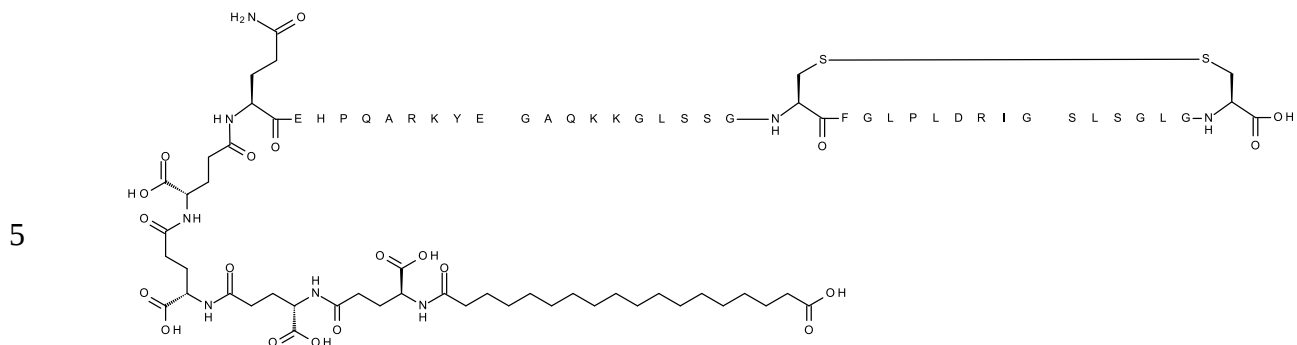
Peso molecular: 4,699.3224. LCMS34: m/3 calculado: 1,567.4408; m/3 encontrado: 1,567.4835;
m/4 calculado: 1,175.8306; m/4 encontrado: 1,176.1075

Quím. 77; Compuesto ID 1390; SEQ ID NO: 68

25

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-([(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)], 5Q, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

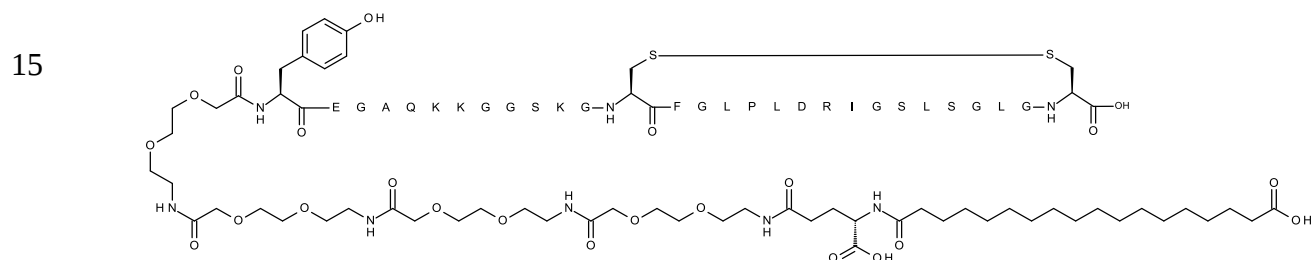
30



Peso molecular: 4,700.2641. LCMS34: m/3 calculado: 1,567.7547; m/3 encontrado: 1,567.5480;
m/4 calculado: 1,176.0660; m/4 encontrado: 1,175.8970

Quím. 78; Compuesto ID 1391; SEQ ID NO: 55

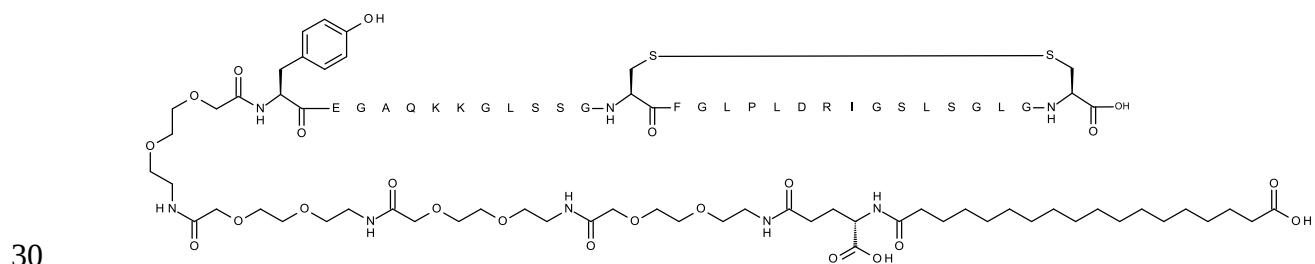
[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 17G, 25P, 32L]-hCNP37

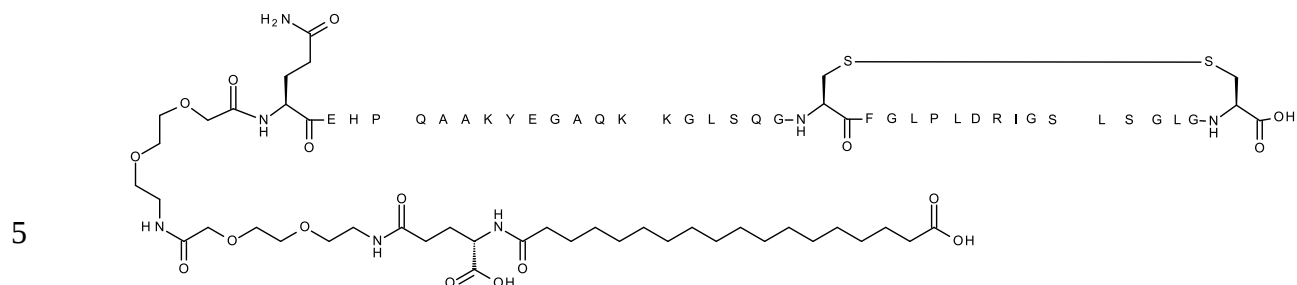


Peso molecular: 3,903.4738. LCMS34: m/3 calculado: 1,302.1579; m/3 encontrado: 1,302.0100;
m/4 calculado: 976.8685; m/4 encontrado: 976.5200

Quím. 79; Compuesto ID 1392; SEQ ID NO: 16

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10E, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

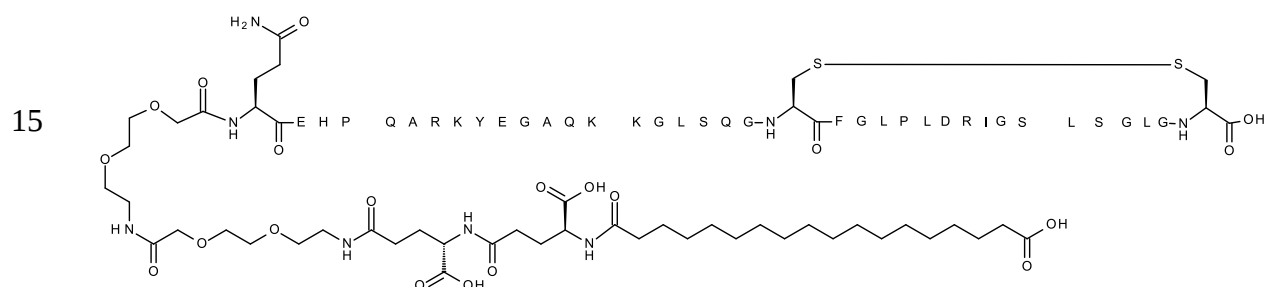




Peso molecular: 4,559.1791. LCMS34: m/3 calculado: 1,520.7264; m/3 encontrado: 1,520.4600;
m/4 calculado: 1,140.7948; m/4 encontrado: 1,140.600

Quím. 83; Compuesto ID 1396; SEQ ID NO: 70

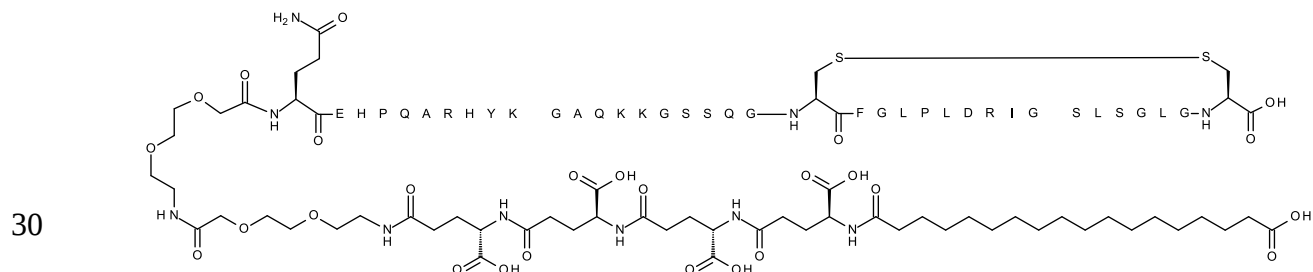
10 [N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi)a
cetil)), 5Q, 10E, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



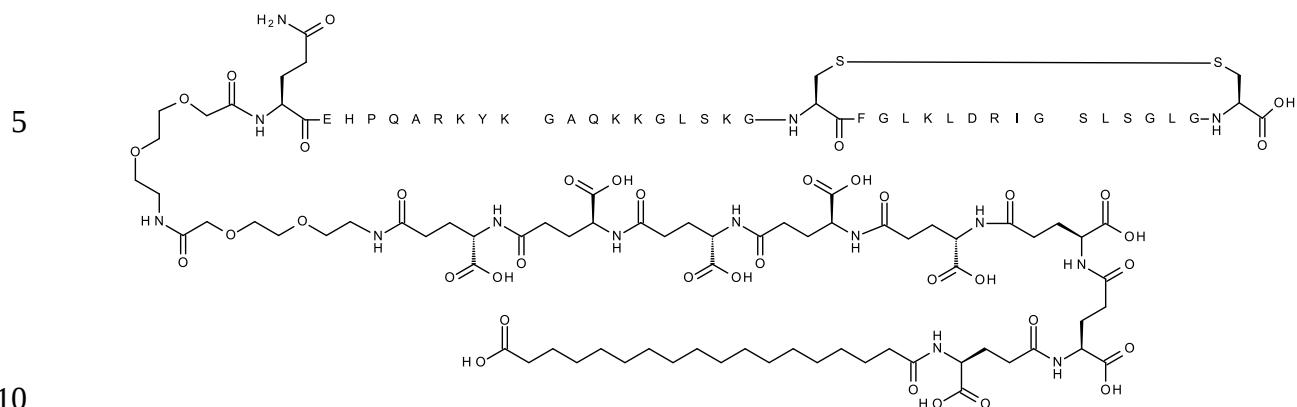
Peso molecular: 4,773.4009. LCMS34: m/3 calculado: 1,592.1336; m/3 encontrado: 1,592.1600;
m/4 calculado: 1,194.3502; m/4 encontrado: 1,194.3700

Quím. 84; Compuesto ID 1398; SEQ ID NO: 72

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], 5Q, 8H, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



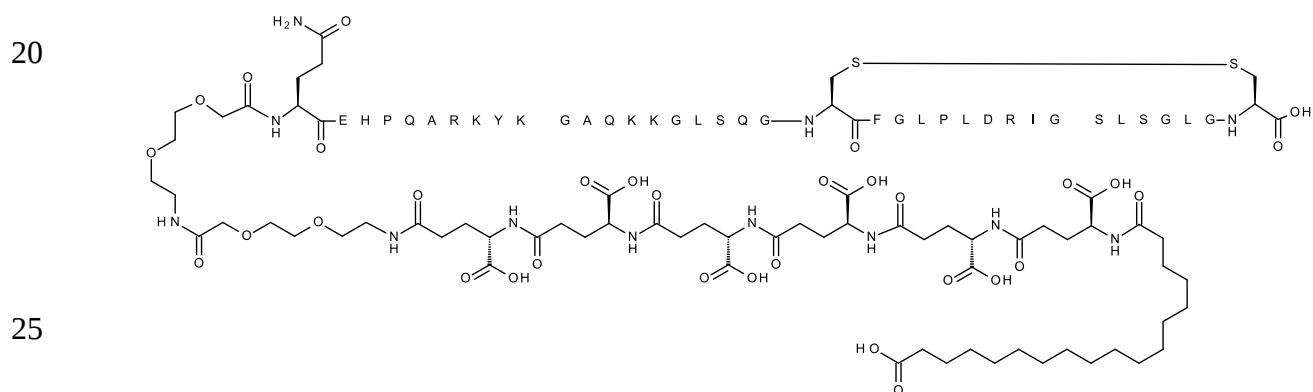
oil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]ace
til)), 5Q, 13Q, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 5,578.2432. LCMS34: m/3 calculado: 1,860.4144; m/3 encontrado: 1,860.2654;
m/4 calculado: 1,395.5608; m/4 encontrado: 1,395.4623

Quím. 88; Compuesto ID 1402; SEQ ID NO: 75

15 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-
carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butan
oil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-
hCNP37

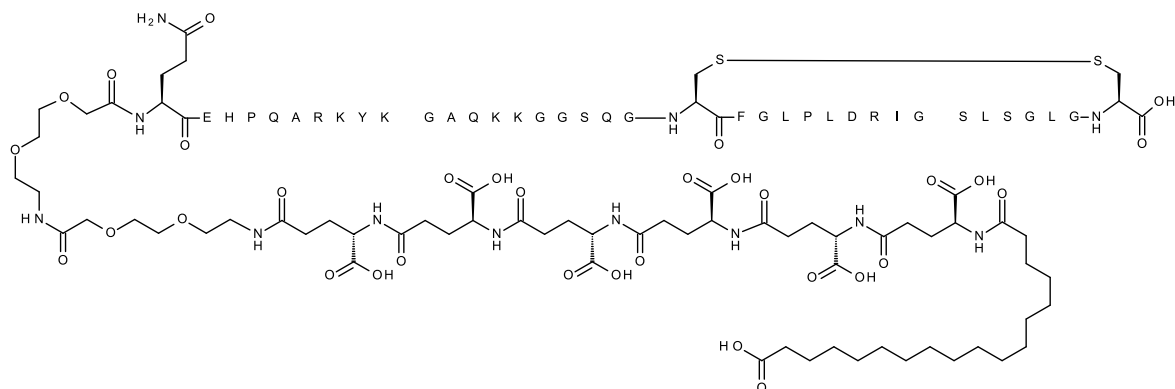


Peso molecular: 5,288.9151. LCMS34: m/3 calculado: 1,763.9717; m/3 encontrado: 1,763.8729;
m/4 calculado: 1,323.2288; m/4 encontrado: 1,323.1718

Quím. 89; Compuesto ID 1403; SEQ ID NO: 76

30 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-
carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

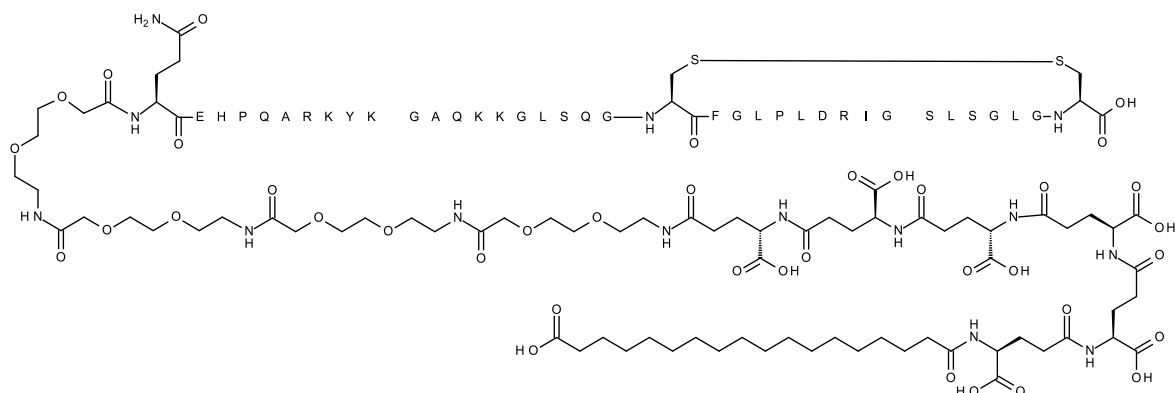
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 5,232.8088. LCMS34: m/3 calculado: 1,745.2696; m/3 encontrado: 1,744.8611;
m/4 calculado: 1,309.2022; m/4 encontrado: 1,309.1547

Quím. 90; Compuesto ID 1404; SEQ ID NO: 75

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

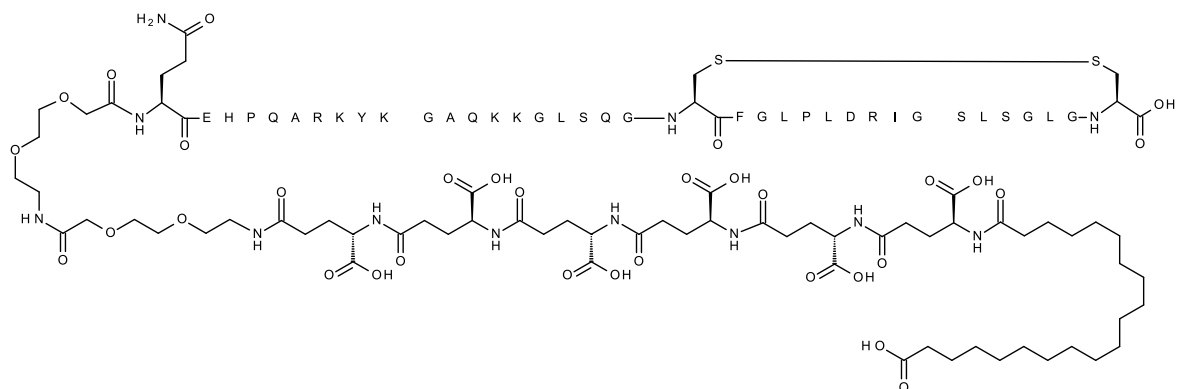


Peso molecular: 5,579.228. LCMS34: m/3 calculado: 1,860.7427; m/3 encontrado: 1,860.6008; m/4 calculado: 1,395.8070; m/4 encontrado: 1,395.7069

Quím. 91; Compuesto ID 1405; SEQ ID NO: 75

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(19-

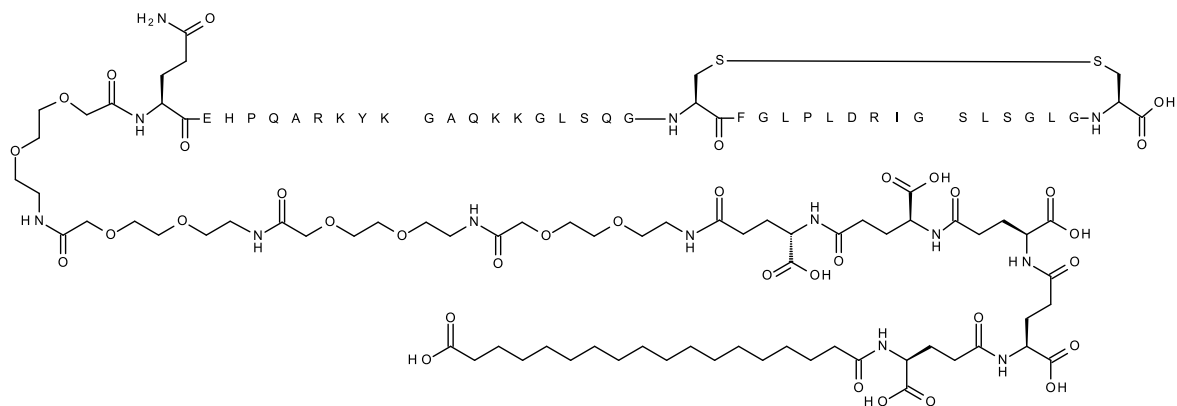
carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 5,316.9683. LCMS34: m/3 calculado: 1,773.3228; m/3 encontrado: 1,773.2192;
m/4 calculado: 1,330.2421; m/4 encontrado: 1,330.1785

Quím. 92; Compuesto ID 1406; SEQ ID NO: 75

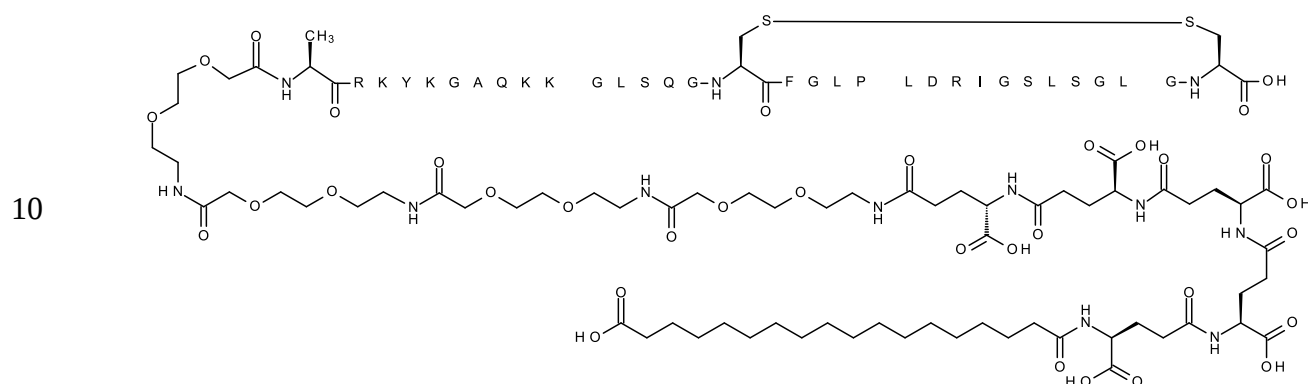
[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



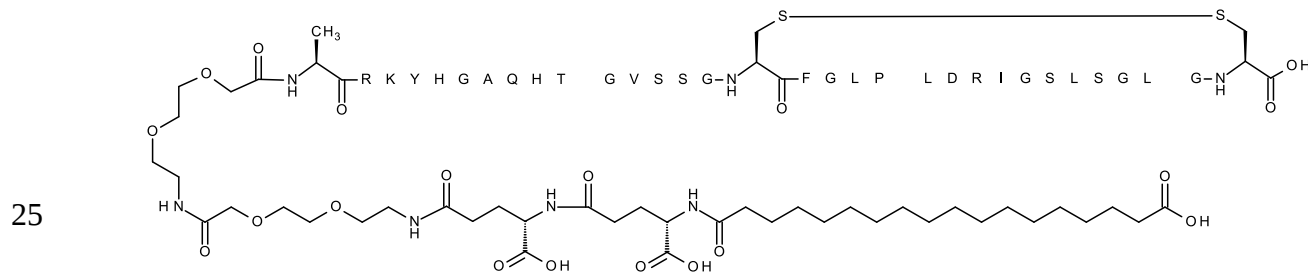
Peso molecular: 5,450.114. LCMS34: m/3 calculado: 1,817.7047; m/3 encontrado: 1,817.5808; m/4 calculado: 1,363.5285; m/4 encontrado: 1,363.4484

Quím. 93; Compuesto ID 9407; SEQ ID NO: 77

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

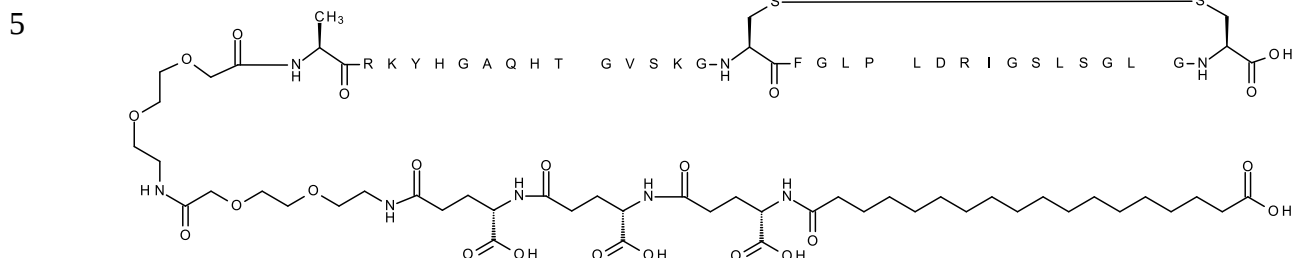


15 Peso molecular: 4,830.4871. LCMS34: m/3 calculado: 1,611.1624; m/3 encontrado: 1,610.8330;
 m/4 calculado: 1,208.6218; m/4 encontrado: 1,208.3823
 Quím. 94; Compuesto ID 1419; SEQ ID NO: 51
 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a
 cetil)), des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,088.6194. LCMS34: m/3 calculado: 1,363.8731; m/3 encontrado: 1,363.6902;
m/4 calculado: 1,023.1549; m/4 encontrado: 1,023.0371
Quím. 95; Compuesto ID 1420; SEQ ID NO: 78

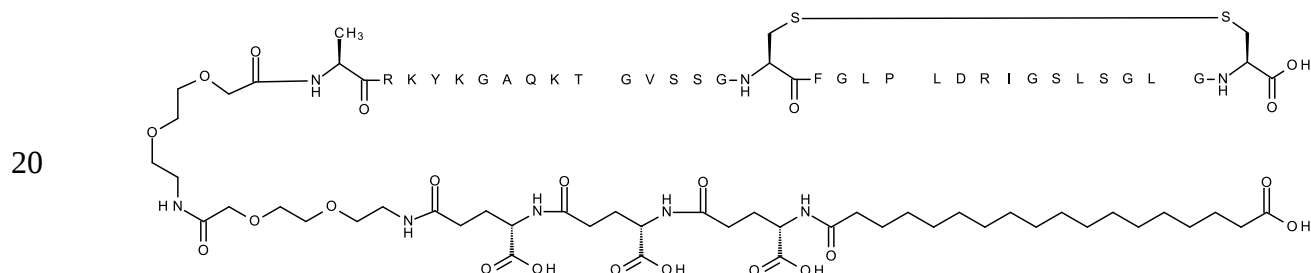
[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 14H, 15T, 17V, 25P, 32L]-hCNP37



10
 Peso molecular: 4,258.8284. LCMS34: m/3 calculado: 1,420.6095; m/3 encontrado: 1,420.3875;
 m/4 calculado: 1,065.7071; m/4 encontrado: 1,065.5448

Quím. 96; Compuesto ID 1421; SEQ ID NO: 79

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



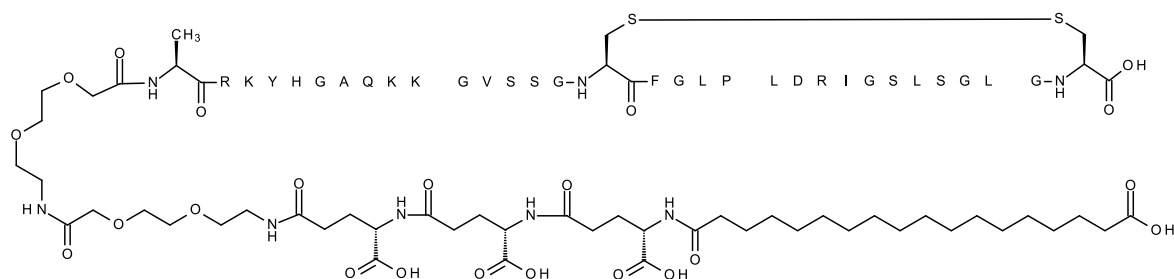
25
 Peso molecular: 4,199.7994. LCMS34: m/3 calculado: 1,400.9331; m/3 encontrado: 1,400.7268;
 m/4 calculado: 1,050.9499; m/4 encontrado: 1,050.8062

Quím. 97; Compuesto ID 1422; SEQ ID NO: 80

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

5



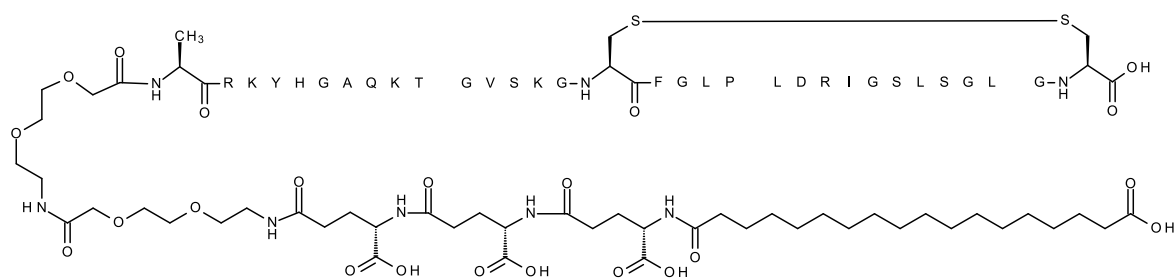
Peso molecular: 4,235.8348. LCMS34: m/3 calculado: 1,412.9449; m/3 encontrado: 1,412.7313;
m/4 calculado: 1,059.9587; m/4 encontrado: 1,059.8075

10

Quím. 98; Compuesto ID 1423; SEQ ID NO: 81

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 4,249.8614. LCMS34: m/3 calculado: 1,417.6205; m/3 encontrado: 1,417.3965;
m/4 calculado: 1,063.4654; m/4 encontrado: 1,063.3148

Quím. 99; Compuesto ID 1424; SEQ ID NO: 82

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-5, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L]-hCNP37

30

CC(C(=O)NCCOCCOC(=O)NCC(=O)O)C(=O)NCC(=O)O

Quím. 100; Compuesto ID 1425; SEQ ID NO: 83

10 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi)a
cetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 15T, 17V, 25P, 32L]-
hCNP37

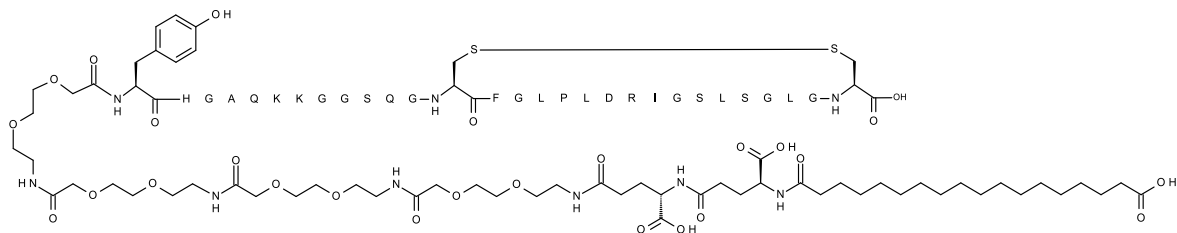
[illegible]

Peso molecular: 4,055.6244. LCMS34: m/3 calculado: 1,352.8748; m/3 encontrado: 1,352.6941;
m/4 calculado: 1,014.9061; m/4 encontrado: 1,014.5325

Quím. 101; Compuesto ID 1426; SEQ ID NO: 84

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[17-(1H-tetrazol-5-
il)heptadecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil))
, des1-5, 10H, 13Q, 15S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

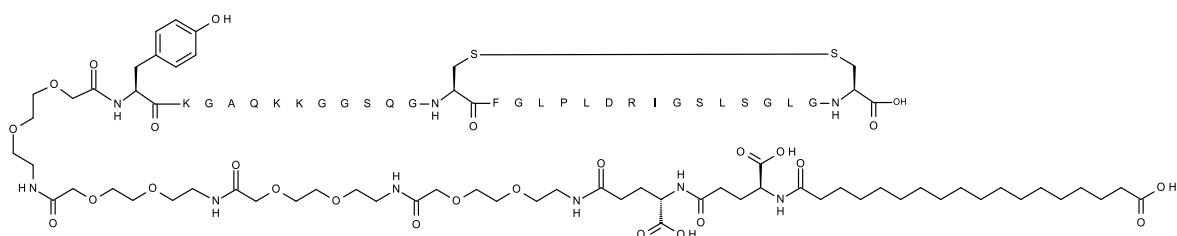
C[C@@H](NC(=O)COCCN(C(=O)OCCOC(=O)NCCC(=O)O)C)C(=O)[R]K[Y][H]G[A]Q[K]S[G]L[S]Q[G]N[C@@H](CS)C(=O)F[G]L[P]L[D]R[I]G[S]L[S]G[L]G[N[C@@H](CS)C(=O)O]



Peso molecular: 4,040.57. LCMS34: m/3 calculado: 1,347.8567; m/3 encontrado: 1,347.9714; m/4 calculado: 1,011.1425; m/4 encontrado: 1,011.2499

Quím. 105; Compuesto ID 9435; SEQ ID NO: 88

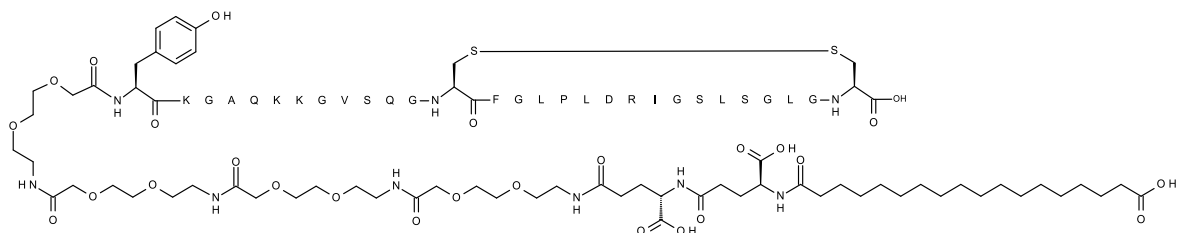
[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,031.603. LCMS34: m/3 calculado: 1,344.8677; m/3 encontrado: 1,344.7600; m/4 calculado: 1,008.9008; m/4 encontrado: 1,008.8210

Quím. 106; Compuesto ID 1436; SEQ ID NO: 89

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 17V, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,073.6828. LCMS34: m/3 calculado: 1,358.8943; m/3 encontrado: 1,358.6617;
m/4 calculado: 1,019.4207; m/4 encontrado: 1,019.2703

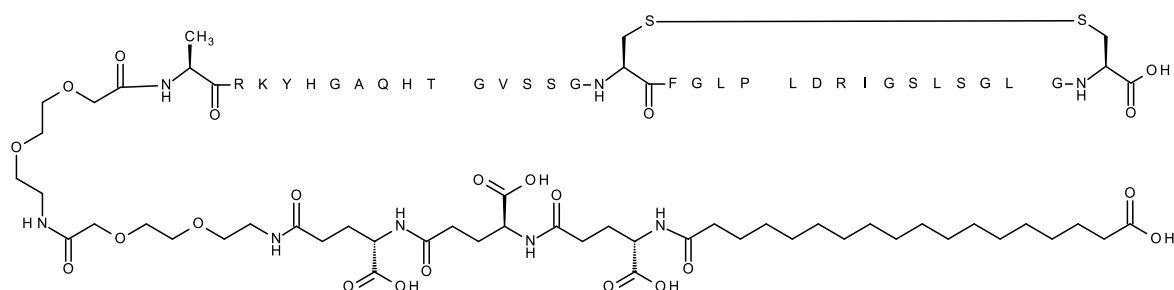
5

10



30

5

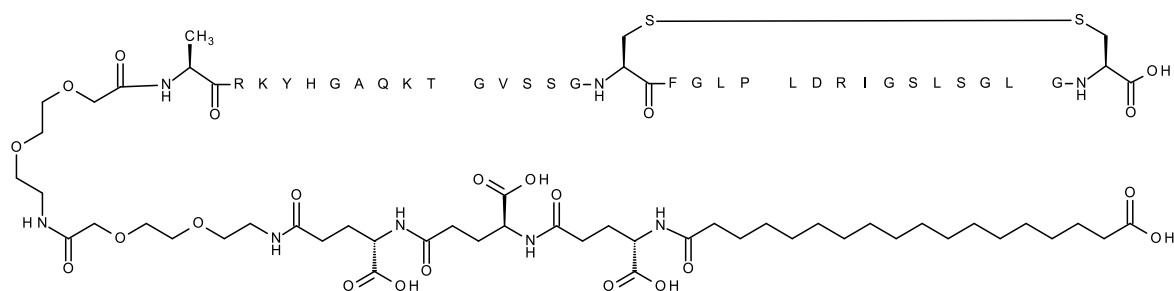


Peso molecular: 4,217.7334. LCMS34: m/3 calculado: 1,406.9111; m/3 encontrado: 9,407.0500;
m/4 calculado: 1,055.4334; m/4 encontrado: 1,055.300

10 Quím. 110; Compuesto ID 1450; SEQ ID NO: 52

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 15T, 17V, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

15



20

Peso molecular: 4,208.7664. LCMS34: m/3 calculado: 1,403.9221; m/3 encontrado: 1,403.7330;
m/4 calculado: 1,053.1916; m/4 encontrado: 1,053.0130

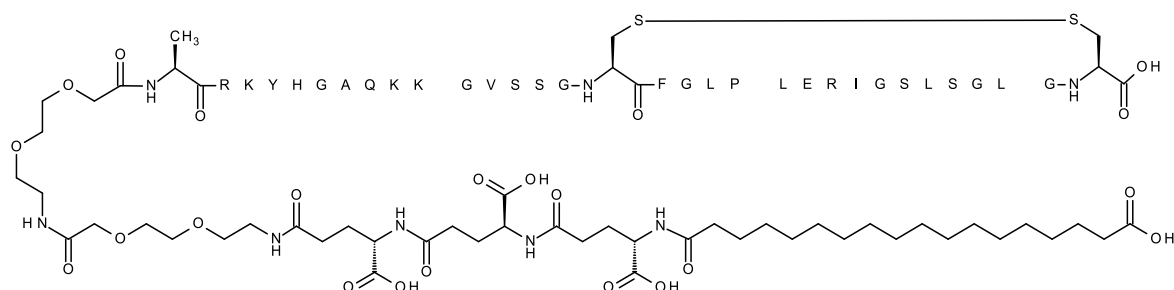
Quím. 111; Compuesto ID 1451; SEQ ID NO: 92

25

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 10H, 13Q, 17V, 19S, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

30

5

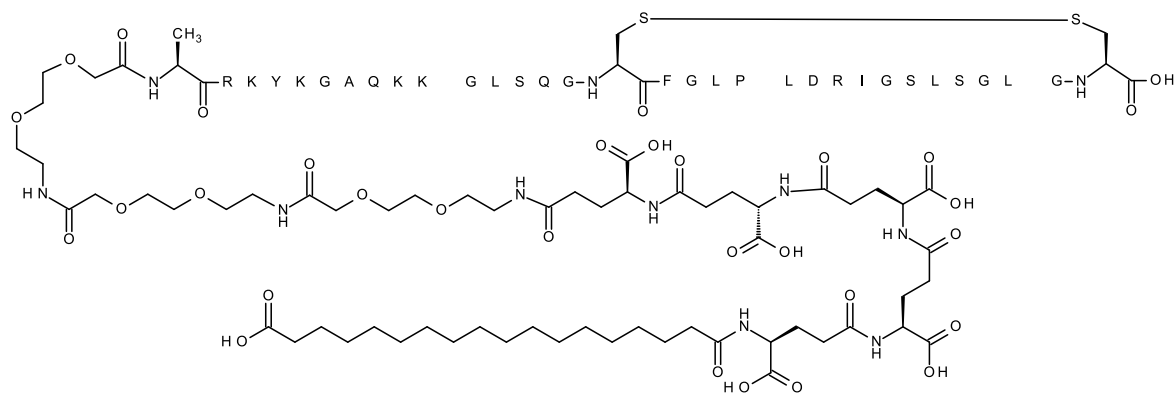


Peso molecular: 4,249.8614. LCMS34: m/3 calculado: 1,417.6205; m/3 encontrado: 1,417.4290;
m/4 calculado: 1,063.4654; m/4 encontrado: 1,063.3310

10 Quím. 112; Compuesto ID 1452; SEQ ID NO: 77

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-
[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butan
oil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 19Q,
15 25P, 32L]-hCNP37

20

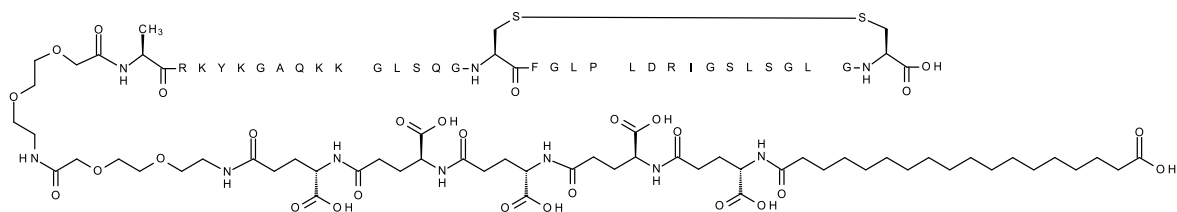


25 Peso molecular: 4,685.3307. LCMS34: m/3 calculado: 1,562.7769; m/3 encontrado: 1,562.3981;
m/4 calculado: 1,172.3327; m/4 encontrado: 1,172.3179

Quím. 113; Compuesto ID 1453; SEQ ID NO: 77

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-
carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butan
oil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

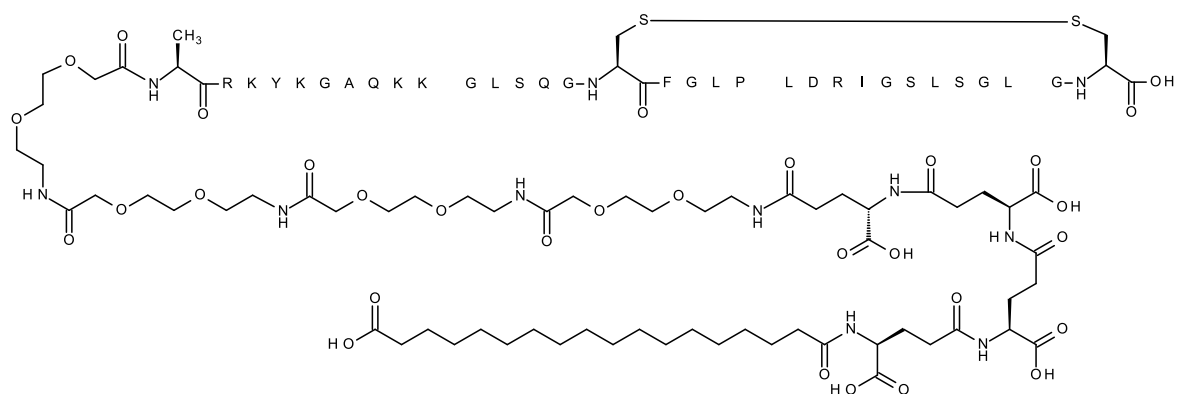
30



Peso molecular: 4,540.1743. LCMS34: m/3 calculado: 1,514.3914; m/3 encontrado: 1,514.0494;
m/4 calculado: 1,136.0436; m/4 encontrado: 1,135.8064

Quím. 114; Compuesto ID 1454; SEQ ID NO: 77

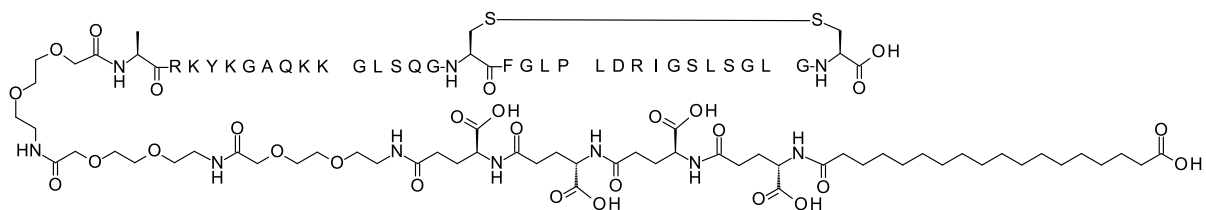
[N-terminal([2-[2-[2-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,701.3732. LCMS34: m/3 calculado: 1,568.1244; m/3 encontrado: 1,567.7415;
m/4 calculado: 1,176.3433; m/4 encontrado: 1,176.0765

Quím. 115; Compuesto ID 1455; SEQ ID NO: 77

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

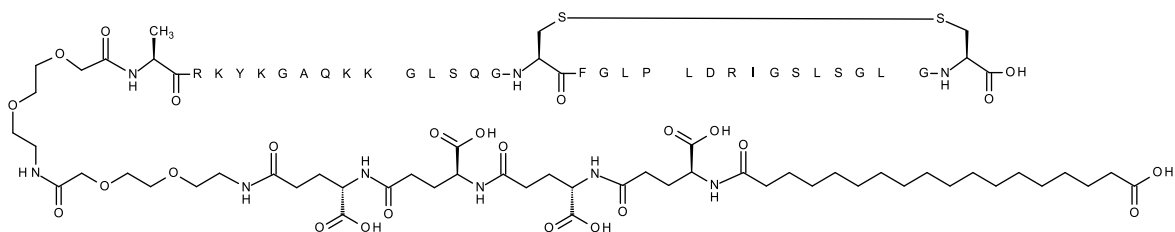


5 Peso molecular: 4,556.2167. LCMS34: m/3 calculado: 1,519.7389; m/3 encontrado: 1,519.3893;
m/4 calculado: 1,140.0542; m/4 encontrado: 1,139.8102

Quím. 116; Compuesto ID 1456; SEQ ID NO: 77

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-

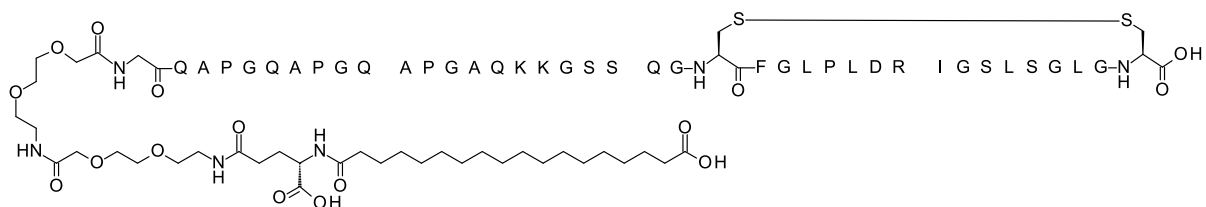
10 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]
etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



15 Peso molecular: 4,411.0603. LCMS34: m/3 calculado: 1,471.3534; m/3 encontrado: 1,471.0409;
m/4 calculado: 1,103.7651; m/4 encontrado: 1,103.5541

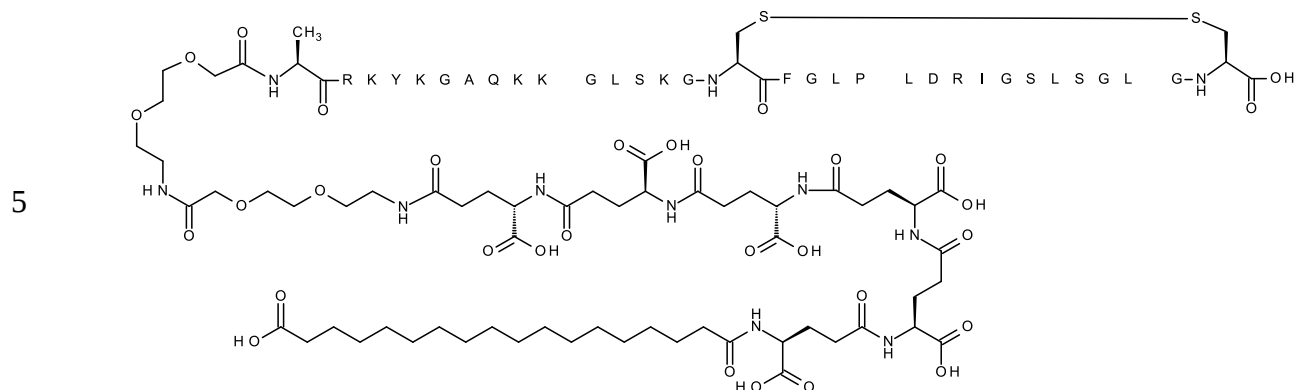
20 Quím. 117; Compuesto ID 1457; SEQ ID NO: 93

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), -2G, -1Q,
2P, 3G, 4Q, 5A, 6P, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



25 Peso molecular: 4,410.9775. LCMS34: m/3 calculado: 1,471.3258; m/3 encontrado: 1,471.0251;
m/4 calculado: 1,103.7444; m/4 encontrado: 1,103.7853

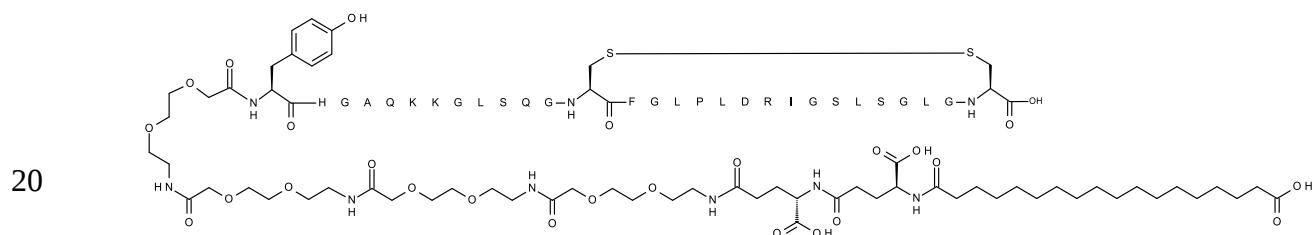
30 Quím. 118; Compuesto ID 1458; SEQ ID NO: 94



10 Peso molecular: 4,669.3313. LCMS34: m/3 calculado: 1,557.4438; m/3 encontrado: 1,557.4031;
m/4 calculado: 1,168.3328; m/4 encontrado: 1,168.0756

Quím. 121; Compuesto ID 1461; SEQ ID NO: 97

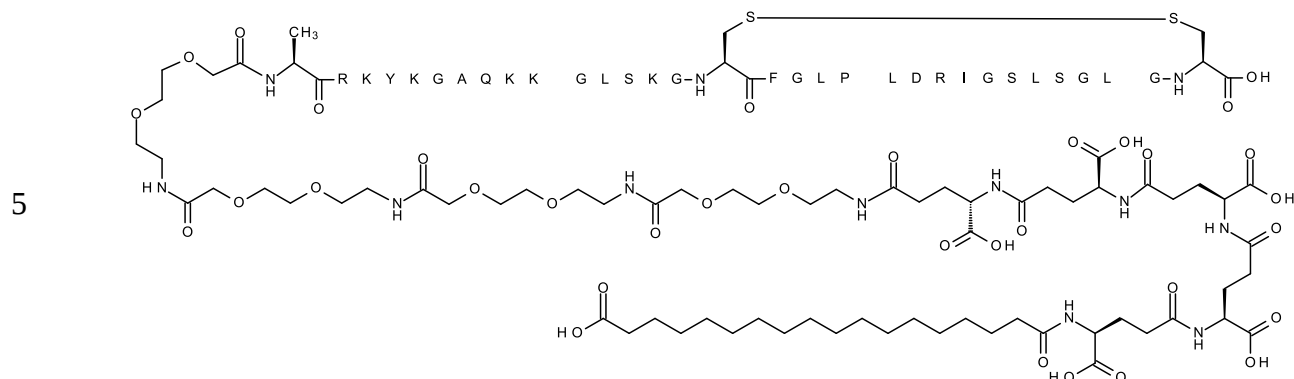
[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 10H, 13Q, 19Q, 25P, 32L]
hCNP37



Peso molecular: 4,096.6763. LCMS34: m/3 calculado: 1,366.5588; m/3 encontrado: 1,366.3214;
m/4 calculado: 1,025.1691; m/4 encontrado: 1,025.0148

Quím. 122; Compuesto ID 1462; SEQ ID NO: 96

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]), des1-5, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

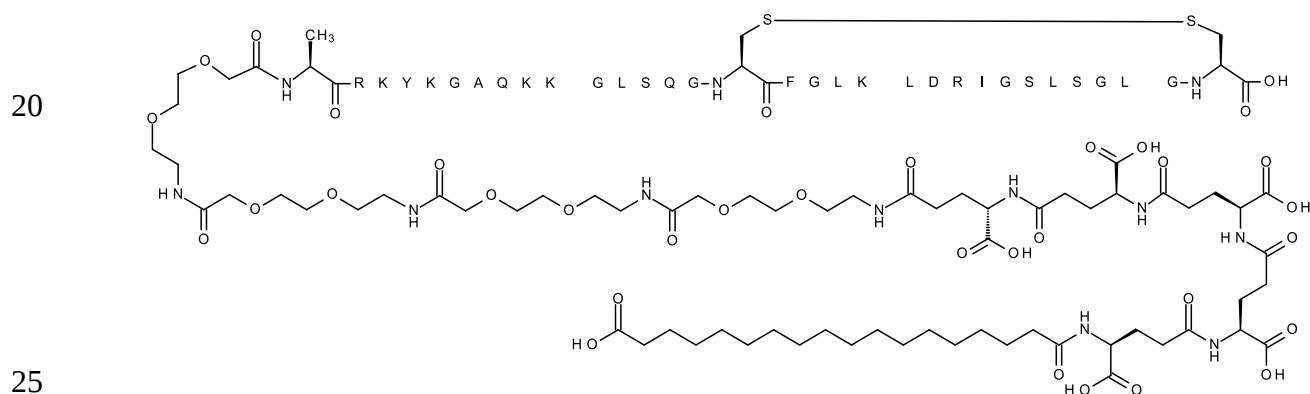


10 Peso molecular: 4,830.5302. LCMS34: m/3 calculado: 1,611.1767; m/3 encontrado: 1,611.1900;
m/4 calculado: 1,208.6326; m/4 encontrado: 1,208.6500

Quím. 123; Compuesto ID 1463; SEQ ID NO: 98

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

15 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 19Q, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,861.5442. LCMS34: m/3 calculado: 1,621.5147; m/3 encontrado: 1,621.1760;
m/4 calculado: 1,216.3861; m/4 encontrado: 1,216.1420

Quím. 124; Compuesto ID 1464; SEQ ID NO: 99

[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-

-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butan

5



15

20

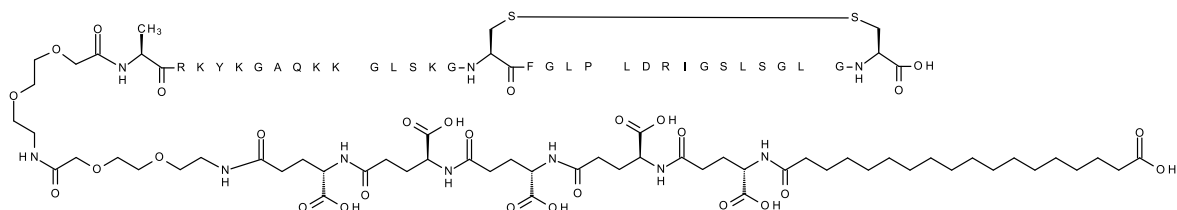


30

125

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37

5



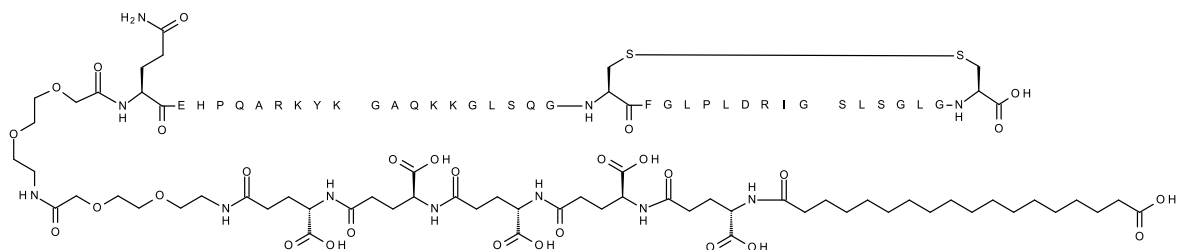
10

Peso molecular: 4,540.2173. LCMS34: m/3 calculado: 1,514.4058; m/3 encontrado: 1,514.1500; m/4 calculado: 1,136.0543; m/4 encontrado: 1,135.8500

Quím. 127; Compuesto ID 1471; SEQ ID NO: 75

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

15



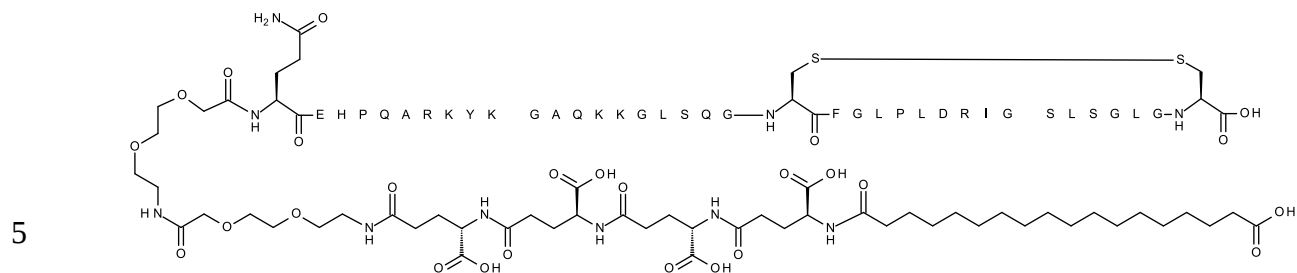
20

Peso molecular: 5,159.8011. LCMS34: m/3 calculado: 1,720.9337; m/3 encontrado: 1,720.8900; m/4 calculado: 1,290.9503; m/4 encontrado: 1,290.9200

Quím. 128; Compuesto ID 1472; SEQ ID NO: 75

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

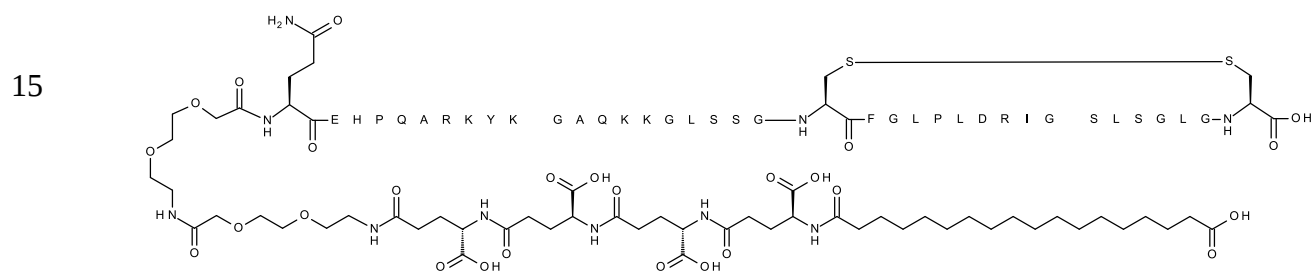
30



Peso molecular: 5,030.6872. LCMS34: m/3 calculado: 1,677.8957; m/3 encontrado: 1,677.8700; m/4 calculado: 1,258.6718; m/4 encontrado: 1,258.6600

Quím. 129; Compuesto ID 1473; SEQ ID NO: 67

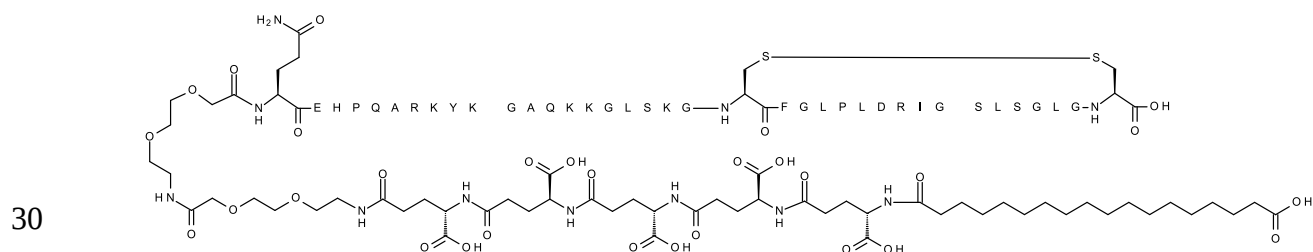
10 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



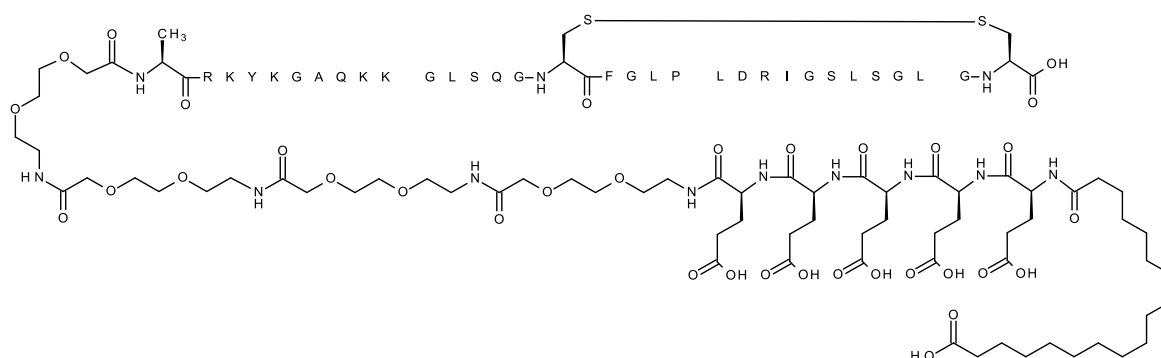
Peso molecular: 4,989.6352. LCMS34: m/3 calculado: 1,664.2117; m/3 encontrado: 1,664.2000; m/4 calculado: 1,248.4088; m/4 encontrado: 1,248.400

Quím. 130; Compuesto ID 1474; SEQ ID NO: 101

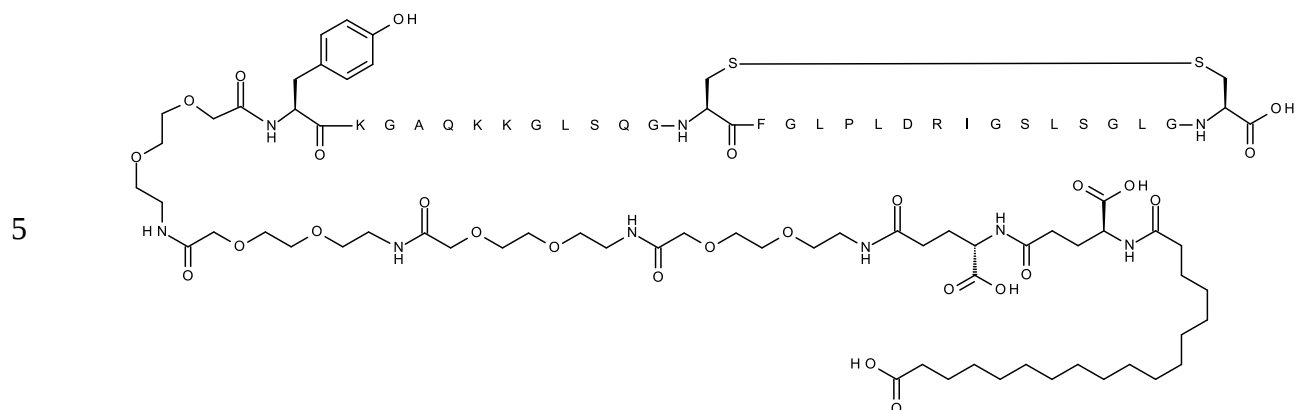
20 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), 5Q, 13Q, 25P, 32L]-hCNP37



[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



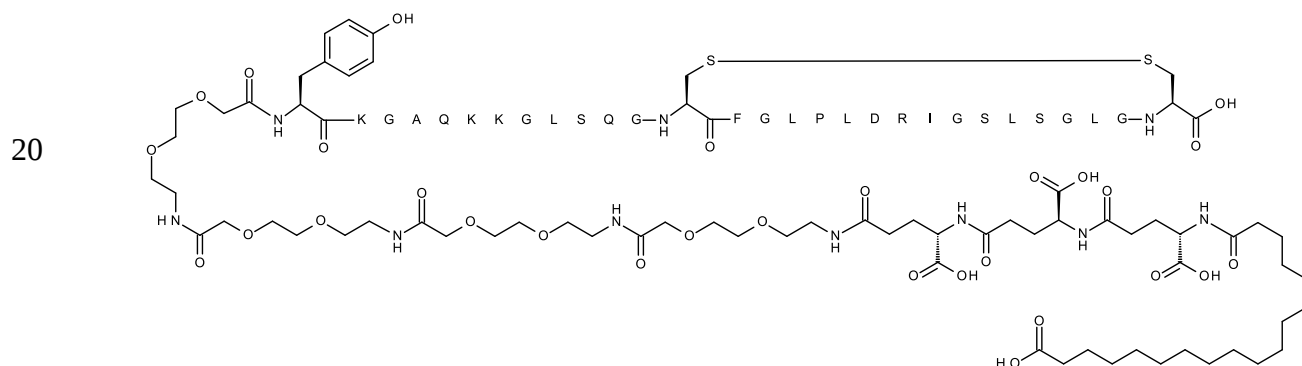
[N-terminal([2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-[[2-[[2-(2S)-4-carboxi-2-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]acetil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-5, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



10 Peso molecular: 4,087.7093. LCMS34: m/3 calculado: 1,363.5698; m/3 encontrado: 1,363.3427;
m/4 calculado: 1,022.9273; m/4 encontrado: 1,022.7753

Quím. 135; Compuesto ID 9480; SEQ ID NO: 103

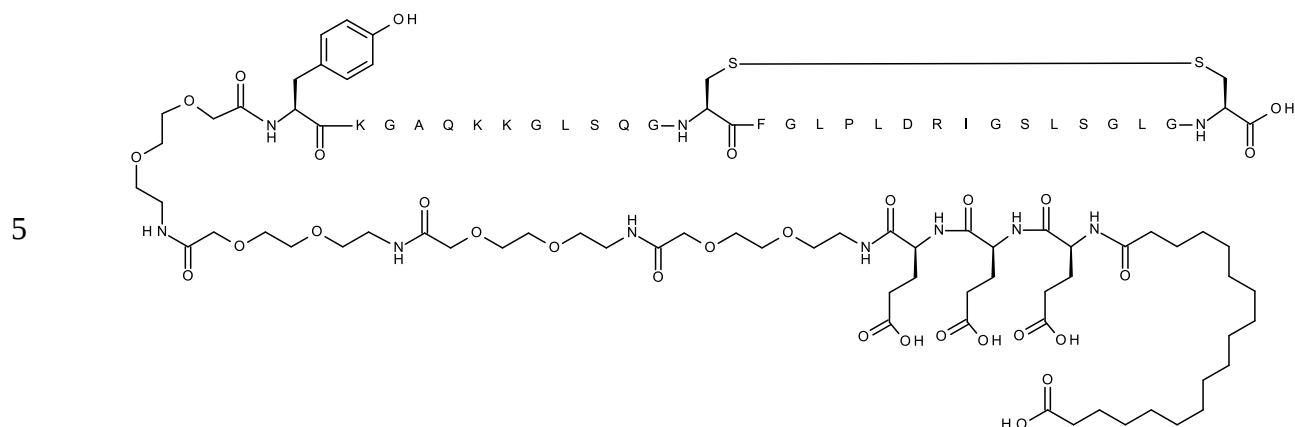
15 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



25 Peso molecular: 4,216.8233. LCMS34: m/3 calculado: 1,406.6078; m/3 encontrado: 1,406.6766;
m/4 calculado: 1,055.2058; m/4 encontrado: 1,055.0295

Quím. 136; Compuesto ID 1481; SEQ ID NO: 103

30 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-4-carboxi-2-[(2S)-4-carboxi-2-[(2S)-4-carboxi-2-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

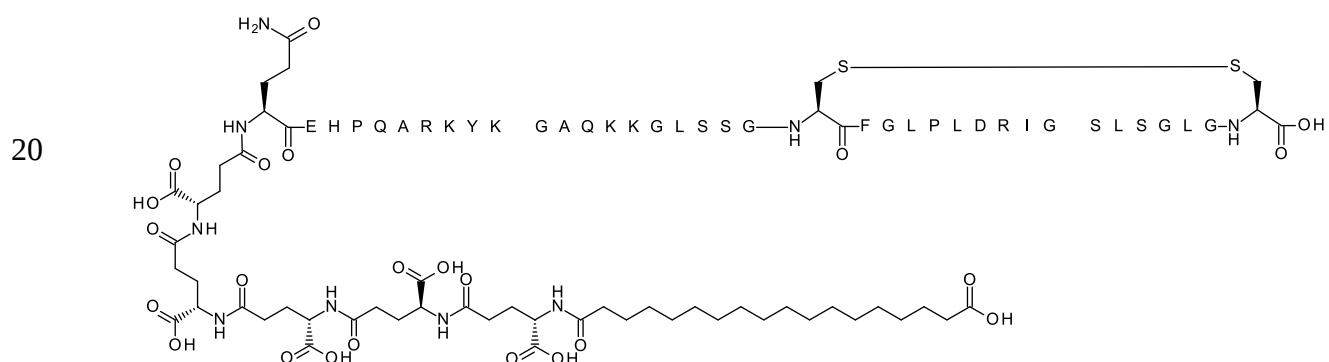


10 Peso molecular: 4,216.8233. LCMS34: m/3 calculado: 1,406.6078; m/3 encontrado: 1,406.3542;
m/4 calculado: 1,055.2058; m/4 encontrado: 1,055.0295

Quím. 137; Compuesto ID 9482; SEQ ID NO: 67

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

oil)), 5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37



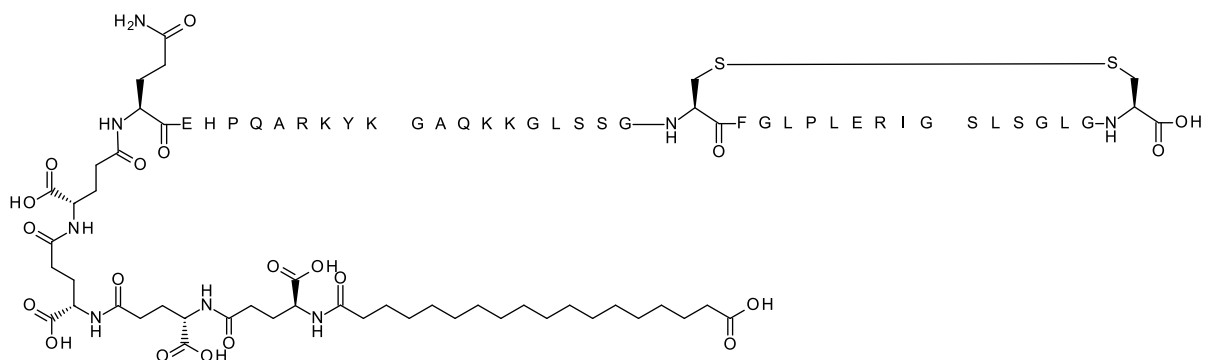
25 Peso molecular: 4,828.4363. LCMS34: m/3 calculado: 1,610.4788; m/3 encontrado: 1,610.4060;
m/4 calculado: 1,208.1091; m/4 encontrado: 1,207.8275

Quím. 138; Compuesto ID 9483; SEQ ID NO: 104

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil]amino]butanoil)), 5Q,

30 19S, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

5

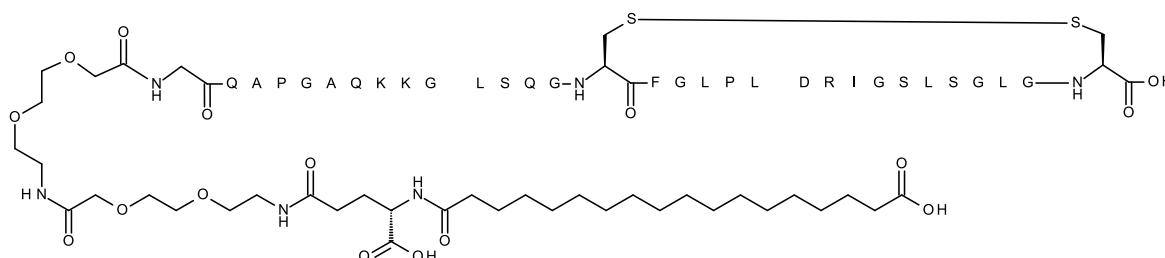


Peso molecular: 4,713.3489. LCMS34: m/3 calculado: 1,572.1163; m/3 encontrado: 1,572.1500;
m/4 calculado: 1,179.3372; m/4 encontrado: 1,179.1200

10 Quím. 139; Compuesto ID 1484; SEQ ID NO: 105

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-6, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

15



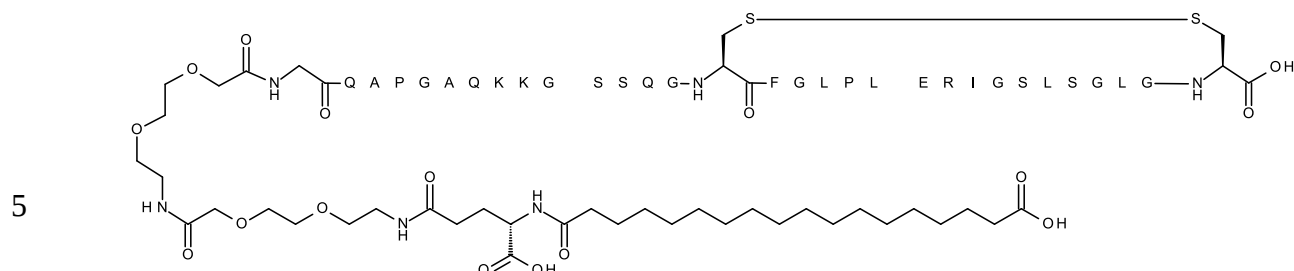
20

Peso molecular: 3,730.3106. LCMS34: m/3 calculado: 1,244.4369; m/3 encontrado: 1,244.7042;
m/4 calculado: 933.5777; m/4 encontrado: 933.5259

Quím. 140; Compuesto ID 1486; SEQ ID NO: 106

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-6, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

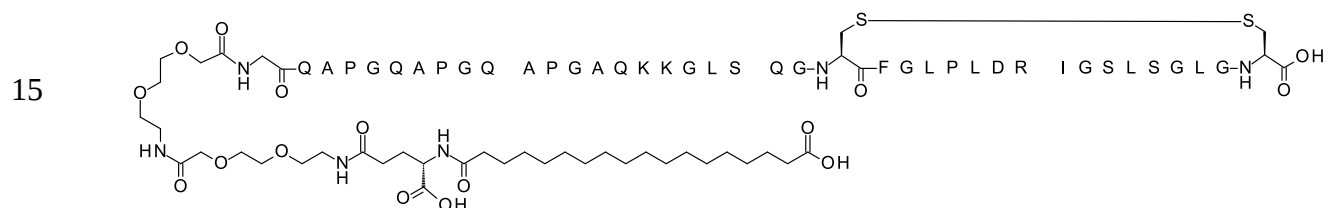
30



Peso molecular: 3,718.2568. LCMS34: m/3 calculado: 1,240.4189; m/3 encontrado: 1,240.3220;
m/4 calculado: 930.5642; m/4 encontrado: 930.4920

10 Quím. 141; Compuesto ID 1487; SEQ ID NO: 107

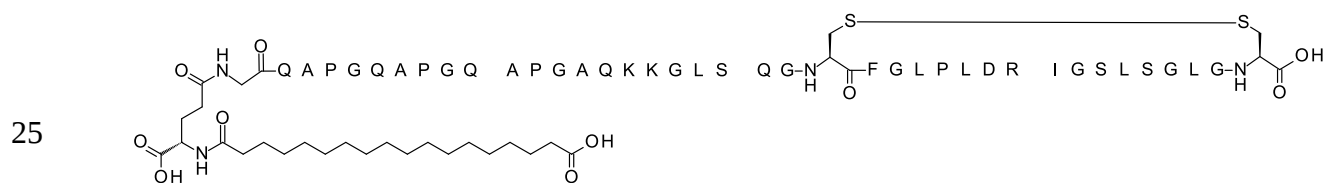
[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), -2G, -1Q, 2P, 3G, 4Q, 5A, 6P, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37



Peso molecular: 4,437.0578. LCMS34: m/3 calculado: 9,480.0193; m/3 encontrado: 1,479.8291;
m/4 calculado: 1,110.2645; m/4 encontrado: 1,110.3766

20 Quím. 142; Compuesto ID 1488; SEQ ID NO: 107

[N-terminal([(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]), -2G, -1Q, 2P, 3G, 4Q, 5A, 6P, 7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

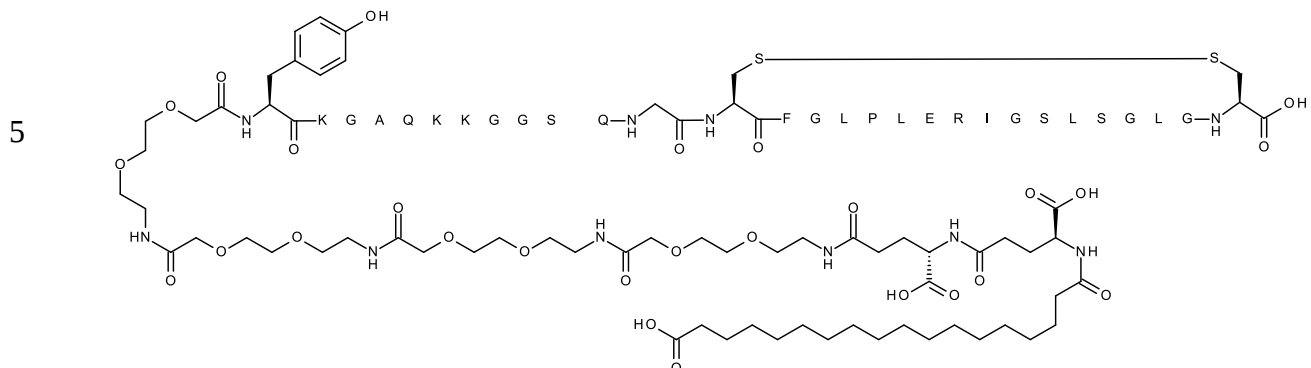


Peso molecular: 4,146.7449. LCMS34: m/3 calculado: 1,383.2483; m/3 encontrado: 1,383.4402;
m/4 calculado: 1,037.6862; m/4 encontrado: 1,037.5803

Quím. 143; Compuesto ID 1489; SEQ ID NO: 108

30 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a

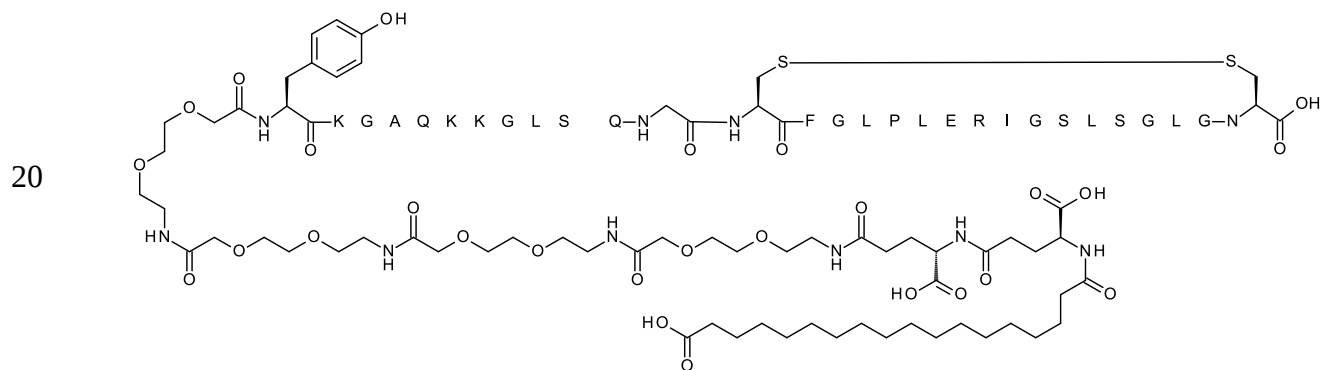
cetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 27E, 32L]-hCNP37



10 Peso molecular: 4,045.6296. LCMS34: m/3 calculado: 1,349.5432; m/3 encontrado: 1,349.3710;
m/4 calculado: 1,012.4074; m/4 encontrado: 1,012.2860

Quím. 144; Compuesto ID 1493; SEQ ID NO: 109

15 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]a
cetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 19Q, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

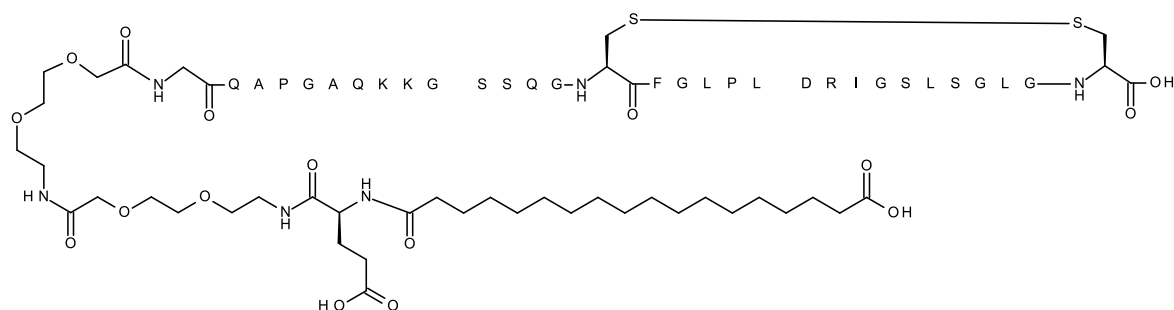


25 Peso molecular: 4,101.7359. LCMS34: m/3 calculado: 1,368.2453; m/3 encontrado: 1,368.0680;
m/4 calculado: 1,026.4340; m/4 encontrado: 1,026.3130

Quím. 145; Compuesto ID 1511; SEQ ID NO: 62

30 [N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-4-carboxi-2-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-6,
7G, 8Q, 9A, 10P, 13Q, 17S, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

5



10

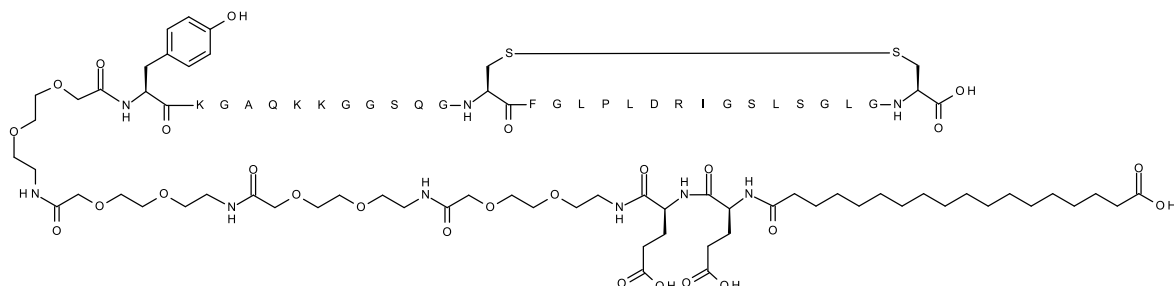
Peso molecular: 3,704.2302. LCMS34: m/3 calculado: 1,235.7434; m/3 encontrado: 1,235.6700; m/4 calculado: 927.0576; m/4 encontrado: 927.0010

Quím. 146; Compuesto ID 1512; SEQ ID NO: 88

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2S)-4-carboxi-2-[(2S)-4-carboxi-2-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)), des1-8, 13Q, 17G, 19Q, 25P, 32L]-hCNP37

15

20



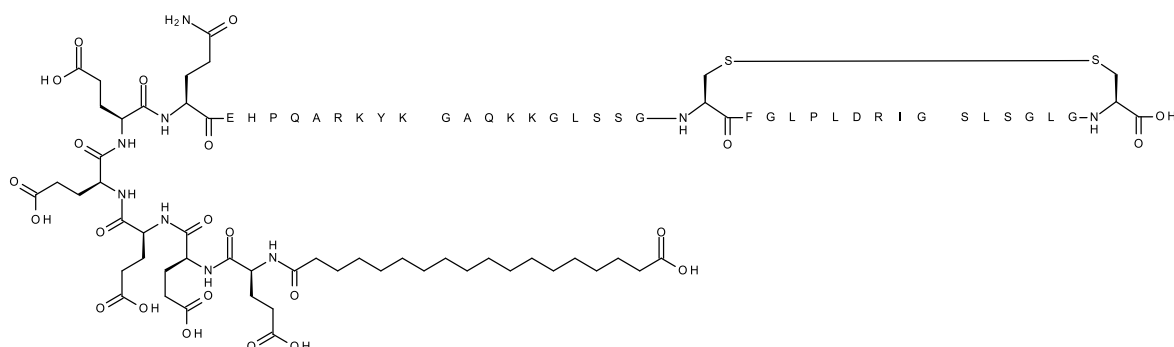
25

Peso molecular: 4,031.603. LCMS34: m/3 calculado: 1,344.8677; m/3 encontrado: 1,344.7600; m/4 calculado: 1,008.9008; m/4 encontrado: 1,008.8080

Quím. 147; Compuesto ID 1513; SEQ ID NO: 110

[N-terminal(17-carboxiheptadecanoil), -5E, -4E, -3E, -2E, -1E, 5Q, 13Q, 19S, 25P, 32L]-hCNP37

30

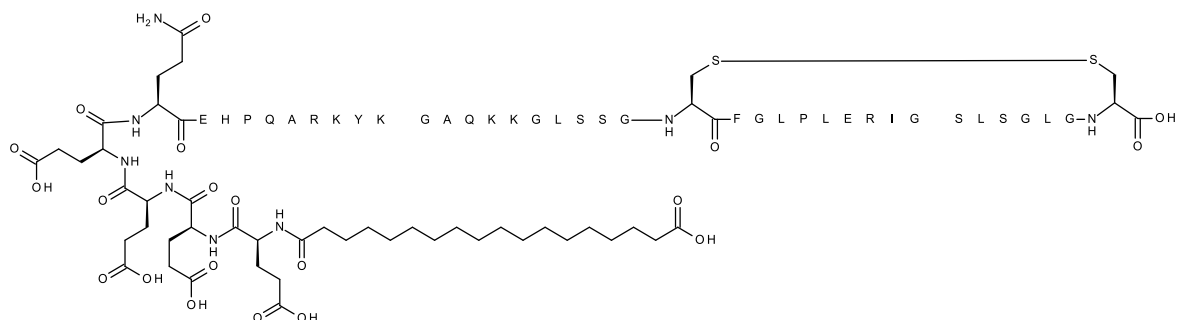


Peso molecular: 4,828.4363. LCMS34: m/3 calculado: 1,610.4788; m/3 encontrado: 1,610.2260;
m/4 calculado: 1,208.1091; m/4 encontrado: 1,207.9160

Quím. 148; Compuesto ID 1514; SEQ ID NO: 111

[N-terminal(17-carboxiheptadecanoil), -4E, -3E, -2E, -1E, 5Q, 13Q, 19S, 25P, 27E, 32L]-hCNP37

5



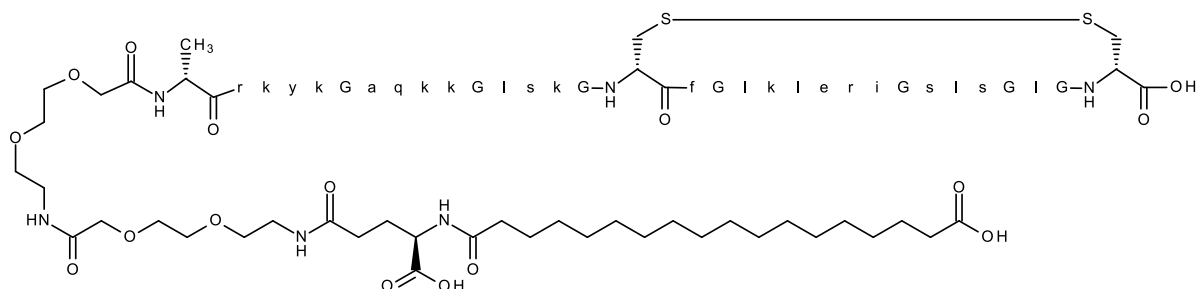
10

Peso molecular: 4,713.3489. LCMS34: m/3 calculado: 1,572.1163; m/3 encontrado: 1,571.8940;
m/4 calculado: 1,179.3372; m/4 encontrado: 1,179.1550

Quím. 149; Compuesto ID 1265; SEQ ID NO: 233

[N-terminal([2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4R)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino) butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil)], des1-5, 6a, 7r, 8k, 9y, 10k, 12a, 13q, 14k, 15k, 17l, 18s, 19k, 21c, 22f, 24l, 25k, 26l, 27e, 28r, 29i, 31s, 32l, 33s, 35l, 37c]-hCNP37

15



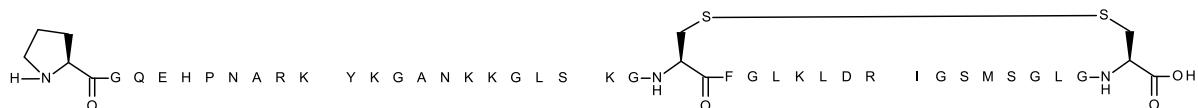
20

Peso molecular: 4,068.8451. LCMS34: m/4 calculado: 1,018.2113; m/4 encontrado: 1,018.1958

Quím. 150; Compuesto ID 0106; SEQ ID NO: 234

[-2P, -1G]-hCNP37

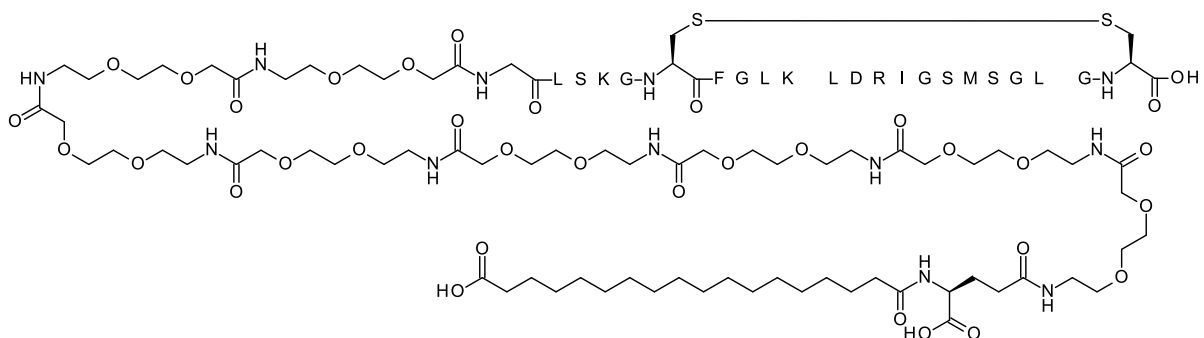
25



30

Peso molecular: 4,102.7254. LCMS34: m/3 calculado: 1,368.5751; m/3 encontrado: 1,368.362; m/4
calculado: 1,026.6814; m/4 encontrado: 1,026.529

Quím. 151; Compuesto ID 0089; SEQ ID NO: 1



Peso molecular: 3,784.4112. LCMS34: m/3 calculado: 1,262.4704; m/3 encontrado: 1,262.303; m/4 calculado: 947.1028; m/4 encontrado: 946.995.

Ejemplo 2: Ensayo de la actividad de hNPR2 *in vitro*

Para evaluar la actividad *in vitro* de CNP22 (0065; Quím. 1) y compuestos de CNP de la invención, se sometieron a prueba para determinar su capacidad de inducir la producción de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en células indicadoras que expresan el receptor del péptido natriurético humano 2 (hNPR2).

Cultivo celular: Para producir la línea celular indicadora, las células HEK293 (ATCC® CRL-1573™) se transfectaron de manera estable con el plásmido indicador pGloSensor-42F (indicador de GMPc - luciferasa GloSensor, Promega) y un plásmido de expresión que codifica el receptor hNPR2. Se aisló un clon de una sola célula para la línea celular indicadora. Cuando las células indicadoras se exponen a un compuesto activador de hNPR2, hNPR2 provoca la producción de GMPc. La luciferasa GloSensor, producida a partir del plásmido pGloSensor-42F, se une a GMPc y esta unión induce un cambio conformacional de la luciferasa GloSensor, lo que activa la enzima de cualquier otra manera inactiva. La luciferasa GloSensor activa es capaz de convertir la luciferina en oxiluciferina, un proceso que produce bioluminiscencia. Tras la lisis celular y el suministro del sustrato de luciferasa, la actividad de luciferasa puede cuantificarse mediante la detección de la luminiscencia. Por lo tanto, la adición de un compuesto activador de hNPR2 y la adición subsecuente del reactivo de detección a las células indicadoras provoca la generación de luminiscencia de una manera dependiente de la dosis. Al someter a prueba un número de concentraciones diferentes del compuesto activador de hNPR2, puede determinarse una concentración efectiva media máxima (EC50). Esta medición, también denominada potencia *in vitro*, se informa para todos los compuestos sometidos a prueba. En todos los experimentos de actividad *in vitro*, se usó CNP22 como control positivo en placa para determinar la activación de hNPR2. Para reducir la variación entre ensayos, también informamos la potencia de cada compuesto con relación a la potencia del control de CNP22 en cada placa.

Procedimiento: Las células HEK293-hNPR2/clon 35 de GloSensor se cultivaron continuamente en medio de selección (DMEM que contiene FCS al 10 %, P/S al 1 %, G418 a 200 µg/ml e higromicina a 100 µg/ml). Para realizar el ensayo, las células se desprendieron con TrypLE Express (Gibco #12604013), se hizo pasar a través de un filtro de células de 70 µm, se contaron y se sembraron en medio de ensayo a 30 µl/pocillo (DMEM sin rojo fenol y con P/S al 1 %) a 10,000 células/pocillo en placas blancas de 384 pocillos (Perkin Elmer #6007680) durante toda la noche. Al día siguiente, los compuestos de prueba se diluyeron en serie en medio de dilución (DMEM sin rojo fenol que contenía OVA al 1 % (Sigma #A5505 lote 04M7001V), Tween20 al 0.01 % (Roche #33766700) y P/S al 1 %) y subsecuentemente se añadieron a las células 10 µl/pocillo de los compuestos de prueba diluidos. Para cada compuesto, se sometieron a prueba diez concentraciones diferentes en el intervalo de 0.25 pM – 10 µM. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se añadió un reactivo de detección Bright-Glo a 40 µl/pocillo (Promega # E2650). Inmediatamente después o después de 15 minutos, se detectó la luminiscencia mediante un lector de placas EnVision Multimode (PerkinElmer). Para determinar la potencia *in vitro* o EC₅₀ de cada compuesto de prueba, se realizó una regresión logística de cuatro parámetros en los datos sin procesar para cada compuesto de prueba mediante el uso del paquete de Python SciPy optimize. Los valores promedio de EC₅₀ se enumeran como “hNPR2 0 % HSA. [EC₅₀ (nM)]” en la Tabla 2. Se calculó una potencia relativa mediante la siguiente expresión: EC₅₀ (control en placa de CNP22)/EC₅₀ (compuesto de prueba)*100, mostrada como “hNPR2 0% HSA. [EC₅₀ % CNP rel]” en la Tabla 2. Se midió un mínimo de dos réplicas para cada compuesto de prueba. Los valores informados son promedios de las réplicas y se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2 – Potencias de NPR2 humano *in vitro* de los compuestos de CNP:

ID del compuesto (ref. quím)	hNPR2 0% HSA. [EC ₅₀ (nM)]	hNPR2 0% HSA. [EC ₅₀ % CNP rel]
0065 (CNP22, quím. 1)	0.28	100.0
1510	0.05	139.2
0312	0.47	80.0
0776	0.58	33.2
1235	1.17	27.2
0262	15.44	1.8
0296	5.50	3.6
0313	48.37	0.7
0334	124.43	2.0
1221	1.17	35.9

5	1222	2.94	14.3
	1223	1.05	6.77
	1224	0.86	16.9
	1225	2.23	29.4
	1226	2.95	7.5
10	1227	1.01	38.2
	1228	11.03	12.3
	1229	4.44	5.3
	1230	6.98	4.2
	1231	5.62	4.1
15	1232	1.63	16.0
	1233	0.81	49.7
	1236	3.40	6.1
	1237	1.95	11.8
	1240	4.01	11.2
20	1241	1.35	30.5
	1242	6.58	5.4
	1274	7.66	13.2
	1287	12.78	2.9
	1288	12.42	3.0
25	1289	12.97	2.9
	1290	5.30	7.0
	1302	2.80	26.5
	1303	1.48	25.5
	1304	2.91	20.7
30	1305	6.98	8.7
	1309	1.35	33.3
	1310	6.88	10.4
	1311	6.79	12.7
	1312	7.82	9.0
	1322	4.73	1.9
	1323	11.24	0.8
	1324	5.51	1.6
	1338	6.77	1.3
	1339	1.03	15.5
	1340	0.18	44.4
	1341	0.48	16.7
	1345	0.38	21.1
	1346	0.47	17.0
	1347	0.52	15.4
	1348	0.35	31.4
	1350	0.39	41.0

5	1351	0.29	55.2
	1352	0.39	38.6
	1353	1.22	9.0
	1354	0.40	27.5
	1355	0.39	28.2
10	1356	0.49	22.4
	1357	2.53	4.3
	1359	0.39	28.2
	1360	0.73	15.1
	1375	0.68	16.2
15	1376	0.12	91.7
	1377	0.39	28.2
	1378	0.33	28.6
	1379	0.35	33.5
	1380	0.72	15.7
20	1381	0.25	38.7
	1382	0.23	43.8
	1383	0.25	43.1
	9384	0.10	53.7
	1385	0.35	30.7
25	1386	0.29	36.9
	1387	0.46	20.6
	1388	0.41	23.5
	1389	0.13	52.3
	1390	0.33	84.6
30	1391	0.35	37.9
	1392	0.45	29.5
	1393	0.42	27.8
	1394	0.21	93.9
	1395	0.04	60.2
	1396	0.07	43.1
	1398	0.14	55.6
	1399	0.13	137.0
	1400	0.26	85.3
	1401	0.56	19.7
	1402	0.24	57.6
	1403	0.25	87.1
	1404	0.31	81.3
	1405	0.31	62.3
	1406	0.28	59.1
	9407	0.16	38.6
	1419	0.33	37.2

5	1420	0.08	87.5
	1421	0.14	50.0
	1422	0.28	75.3
	1423	0.31	37.7
	1424	0.19	36.2
10	1425	0.25	26.4
	1426	0.19	76.2
	1431	1.11	14.3
	1432	0.43	26.0
	1434	0.46	29.0
15	9435	0.07	73.6
	1436	0.23	30.2
	1437	0.35	19.9
	1448	0.24	33.3
	1449	0.16	110.0
20	1450	0.24	84.2
	1451	0.72	47.5
	1452	0.03	57.6
	1453	0.04	33.5
	1454	0.02	63.6
25	1455	0.03	43.4
	1456	0.03	50.4
	1457	0.02	79.4
	1458	0.02	93.6
	1459	0.02	76.1
30	1460	0.04	32.4
	1461	0.20	28.9
	1462	0.01	106.6
	1463	0.30	20.0
	1464	0.12	48.8
	1465	0.25	24.0
	1470	0.06	23.9
	1471	0.03	40.2
	1472	0.03	52.0
	1473	0.01	107.7
	1474	0.03	62.5
	1475	0.13	46.5
	1476	0.12	48.4
	1477	0.13	10.3
	1478	0.05	26.6
	9480	0.05	45.2
	1481	0.02	35.1

9482	0.06	39.4
9483	0.30	10.2
1484	0.03	27.9
1486	0.14	6.0
1487	0.04	22.0
1488	0.03	29.3
1489	0.22	3.7
1493	0.80	11.5
1265	>1000	N/A
0106	0.18	201.1
0089	12.25	3.1
0230	29.23	0.4
0231	14.53	0.8

Estos datos demuestran que los compuestos de CNP probados abarcan un amplio intervalo de niveles de activación de NPR2 *in vitro* y que los compuestos de CNP cargados negativamente comúnmente muestran una potencia reducida de NPR2 *in vitro* con relación a los compuestos de CNP cargados positivamente.

Ejemplo 3: Estabilidad con neprilisina de los compuestos de CNP *in vitro*

Se ha informado que el CNP nativo puede metabolizarse por la neprilisina (endopeptidasa neutra, NEP), que es una proteasa que está ampliamente presente en el cuerpo. Por lo tanto, se configuró un ensayo de estabilidad con neprilisina *in vitro* para someter a prueba la degradación mediada por la neprilisina de compuestos de CNP seleccionados.

Procedimiento: Brevemente, el tampón de ensayo consistió en tampón de PBS (pH 7.4, ThermoFisher Scientific) con una concentración final de 0.005 % v/v de tween 20 (Sigma-Aldrich). La neprilisina humana recombinante (rhNEP; R&D Systems) y los compuestos de CNP se disolvieron en tampón de ensayo. Se incluyó CNP22 nativo (0065, Quím. 1) como control positivo en cada día de incubación. Inicialmente, se preincubó el compuesto de CNP (la concentración final fue 1,000 nM) en tampón de ensayo durante 10 min a 37 °C. El ensayo se inició mediante la adición de rhNEP (la concentración final fue 2 µg de proteína por ml) o tampón de ensayo (experimento de absorción) y la incubación se realizó a 37 °C. La reacción se finalizó en puntos temporales seleccionados (0.5; 5; 15; 30; 60; 90 y 120 min) mediante la adición de un volumen de mezcla de incubación a tres volúmenes de etanol (que contenía 1 % v/v de ácido fórmico). La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Después de la centrifugación, se mezcló un volumen de sobrenadante con un volumen de agua Milli-Q.

Análisis mediante LCMS: La mezcla se analizó mediante LCMS mediante el uso de una columna analítica Acquity UPLC Peptide CSH C18 de Waters (130 Å, 1.7 µm, 1*50 mm) operada a 60 °C. Se realizó una elución en gradiente con un sistema UHPLC Nexera (Shimadzu) mediante el uso de la fase móvil A (que consistía en agua Milli-Q con ácido fórmico al 0.1 %) y la fase móvil B (que consistía en acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 %). El flujo fue 0.3 ml/min. Se usó un espectrómetro de masas zenoTOF 7600 (Sciex) como detector y se operó en modo de ionización por electropulverización positiva. Los datos se registraron en modo de barrido completo (m/z 300-1,700).

Se prepararon curvas de calibración en tampón de ensayo y se trataron como muestras del estudio.

Estas muestras se usaron para calcular la concentración del compuesto de CNP relevante en las muestras *in vitro*. Se incluyeron muestras de control de calidad. Para al menos el 75 % de los estándares y QC, la desviación entre la concentración nominal y calculada fue inferior al 20 %.

Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. Los datos se informaron cómo por ciento restante a los 90 min (basado en las concentraciones calculadas) en comparación con la concentración promedio en las muestras de puntos temporales de 0.5 min. Un ejemplo de siete compuestos y CNP22 (0065, Quím. 1) se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 - Por ciento restante de compuestos de CNP tras la incubación con rhNEP durante 90 minutos

Compuesto	Resto del original después de 90 min (%)
0065* (CNP22)	1.7
0106	95.1
9384	87.8
9407	96.6
9435	93.2
9480	98.3
9482	96.3
9483	105.6

*: Analizar como control positivo dentro de cada experimento

Estos datos demuestran que los compuestos de CNP de la presente invención son sustancialmente estables en presencia de neprilisina humana recombinante en comparación con CNP22 que se degrada rápidamente.

Ejemplo 4: Cálculo de la carga neta del péptido

La carga de un grupo ionizable en un péptido a un pH dado puede calcularse mediante el uso de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, mediante el uso de constantes de disociación de ácidos (pKa)

determinadas empíricamente para cada residuo de aminoácido o grupo modificador como se conoce bien en la técnica, por ejemplo, como mediante el método descrito por B. Skoog y A. Wichman (Trends in Analytical Chemistry, 1986, vol. 5, pp. 82-83.) y L. Kozlowski (Biology Direct, 2016, 11:55). Esto se muestra para aminoácidos o grupos modificadores cargados negativamente en la Ecuación 1 y para aminoácidos y grupos modificadores cargados positivamente en la Ecuación 2, en las que pKn es el pKa del grupo cargado negativamente y pKp es la pKa del grupo cargado positivamente y donde el pH en la ecuación es el pH de interés. La carga neta de un péptido a un pH dado es entonces la suma de las cargas negativas y positivas de todos los grupos ionizables en el péptido.

Ecuación 1:

$$\sum_{i=1}^n \frac{-1}{1 + 10^{pKn-pH}}$$

Ecuación 2:

$$\sum_{i=1}^n \frac{1}{1 + 10^{pH-pKp}}$$

Para los residuos de aminoácidos naturales, las constantes pKa tabuladas se usan para terminales libres y sitios ionizables en las cadenas laterales. Los valores de pKa para aminoácidos modificados y grupos modificadores se estimaron mediante el paquete ACD/Labs ver. 12 y también se muestran en la Tabla 4.

Como un ejemplo, para calcular la carga neta del compuesto 9482 a pH 7.4, la suma de las cargas negativas portadas por las posiciones Cys37 (ácido C-terminal), Asp27, Glu2, gGlu (1), gGlu (2), gGlu (3), gGlu (4), gGlu (5) y ácido graso C18d es menos 8.995 Fd cuando se usan los valores de pKa mostrados en la Tabla 4. La suma de las cargas positivas portadas por las posiciones Arg28, Lys15, Lys14, Lys10, Lys8, Arg7 e His3 es 6.162 Fd. La carga neta es entonces la suma de lo anterior que es menos 2.833.

Los valores de carga calculados para el pH seleccionado (pH 7.4 y pH 6.5) mediante el uso del principio anterior para los compuestos de CNP de la presente invención se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4: Valores de pKa para terminales, cadenas laterales de aminoácidos y grupos modificadores usados al calcular pI y carga neta de los compuestos de CNP

Residuo	N-terminal	C-terminal	Cadena lateral
Ala	7.8	3.7	N/A
Arg	7.4	3.6	13.3

Asn	6.1	3.5	N/A
Asp	7.4	3.5	4.2
Cys	6.1	3.3	9.1
Gln	6.9	3.5	N/A
Glu	8.4	3.5	4.4
Gly	7.3	3.7	N/A
His	6.1	3.1	6.7
Ile	7.9	3.7	N/A
Leu	7.9	3.7	N/A
Lys	7.2	3.6	10.4
Met	6.9	3.5	N/A
Phe	7.0	3.6	N/A
Pro	8.9	3.4	N/A
Ser	6.3	3.3	N/A
Thr	6.3	3.3	N/A
Trp	7.7	3.7	N/A
Tyr	7.3	3.7	9.8
Val	7.9	3.7	N/A
Cys en disulfuro	6.1	3.3	N/A
C18d	N/A	N/A	4.8
C20d	N/A	N/A	4.8
Tetrazol-C18	N/A	N/A	5.1
gGlu	N/A	N/A	3.5

Tabla 5: Valores calculados de carga neta (Q) a pH 7.4 y carga neta a 6.5 para los compuestos de CNP

Núm. Quím	ID del compuesto	Q (pH=7.4)	Q (pH=6.5)
1	0065	1.4	1.9
2	1510	5.4	6.4
3	0312	4.0	4.0
4	0776	4.0	4.0
5	1235	0.2	0.6
6	0262	-3.0	-3.0
7	0296	-3.0	-3.0
8	0313	-3.0	-3.0
9	0334	-3.0	-3.0
10	1221	0.0	0.0
11	1222	-1.0	-1.0
12	1223	-2.0	-2.0
13	1224	-1.0	-1.0

5	14	1225	-1.0	-1.0
	15	1226	-3.0	-3.0
	16	1227	-2.0	-2.0
	17	1228	-4.0	-4.0
	18	1229	-1.0	-1.0
10	19	1230	-2.0	-2.0
	20	1231	-2.0	-2.0
	21	1232	0.0	0.0
	22	1233	0.0	0.0
	23	1236	-1.8	-1.4
15	24	1237	-0.8	-0.4
	25	1240	-1.8	-1.4
	26	1241	-0.8	-0.4
	27	1242	-2.8	-2.4
	28	1274	-3.0	-3.0
20	29	1287	-4.0	-4.0
	30	1288	-4.0	-4.0
	31	1289	-4.0	-4.0
	32	1290	-3.0	-3.0
	33	1302	-1.8	-1.4
25	34	1303	-1.8	-1.4
	35	1304	-2.7	-1.8
	36	1305	-1.8	-1.4
	37	1309	-0.8	-0.4
	38	1310	-1.8	-1.4
30	39	1311	-1.8	-1.4
	40	1312	-2.8	-2.4
	41	1322	-0.5	0.9
	42	1323	-1.5	-0.2
	43	1324	-1.7	-0.8
	44	1338	-2.0	-2.0
	45	1339	-2.0	-2.0
	46	1340	-0.7	0.2
	47	1341	-1.7	-0.8
	48	1345	-0.5	0.9
	49	1346	-1.5	-0.2
	50	1347	-0.8	-0.4
	51	1348	-0.8	-0.4
	52	1350	-0.7	0.2
	53	1351	-0.7	0.2
	54	1352	-1.8	-1.4
	55	1353	-0.8	-0.4

5	56	1354	-0.8	-0.4
	57	1355	0.0	0.0
	58	1356	-1.0	-1.0
	59	1357	-0.8	-0.4
	60	1359	-0.8	-0.4
10	61	1360	-1.7	-0.8
	62	1375	-1.0	-1.0
	63	1376	-1.0	-1.0
	64	1377	-1.0	-1.0
	65	1378	-2.0	-2.0
15	66	1379	-1.8	-1.4
	67	1380	-2.8	-2.3
	68	1381	-2.2	0.1
	69	1382	-1.7	-0.8
	70	1383	-2.4	-0.5
20	71	9384	-1.0	-1.0
	72	1385	-2.0	-2.0
	73	1386	-1.0	-1.0
	74	1387	-3.0	-3.0
	75	1388	-2.0	-2.0
25	76	1389	-1.8	-1.4
	77	1390	-3.8	-3.4
	78	1391	-1.0	-1.0
	79	1392	-2.0	-2.0
	80	1393	-2.0	-2.0
30	81	1394	-0.8	-0.4
	82	1395	-1.8	-1.4
	83	1396	-1.8	-1.4
	84	1398	-2.7	-1.8
	85	1399	-2.7	-1.8
	86	1400	-2.7	-1.8
	87	1401	-3.8	-3.4
	88	1402	-3.8	-3.4
	89	1403	-3.8	-3.4
	90	1404	-3.8	-3.4
	91	1405	-3.8	-3.4
	92	1406	-2.8	-2.4
	93	9407	-2.0	-2.0
	94	1419	-1.7	-0.8
	95	1420	-1.7	-0.8
	96	1421	-1.0	-1.0
	97	1422	-0.8	-0.4

5	98	1423	-0.8	-0.4
	99	1424	-1.0	-1.0
	100	1425	-1.8	-1.4
	101	1426	-0.8	-0.4
	102	1431	-1.8	-1.4
10	103	1432	-1.8	-1.4
	104	1434	-1.8	-1.4
	105	9435	-1.0	-1.0
	106	1436	-1.0	-1.0
	107	1437	-1.8	-1.4
15	108	1448	-2.8	-2.4
	109	1449	-2.7	-1.8
	110	1450	-1.8	-1.4
	111	1451	-0.8	-0.4
	112	1452	-2.0	-2.0
20	113	1453	-2.0	-2.0
	114	1454	-1.0	-1.0
	115	1455	-1.0	-1.0
	116	1456	-1.0	-1.0
	117	1457	-1.0	-1.0
25	118	1458	-1.0	-1.0
	119	1459	-1.0	-1.0
	120	1460	-2.0	-2.0
	121	1461	-1.8	-1.4
	122	1462	-1.0	-1.0
30	123	1463	-1.0	-1.0
	124	1464	-2.0	-2.0
	125	1465	-2.0	-2.0
	126	1470	-1.0	-1.0
	127	1471	-2.8	-2.4
	128	1472	-1.8	-1.4
	129	1473	-1.8	-1.4
	130	1474	-1.8	-1.4
	131	1475	-2.0	-1.9
	132	1476	-2.0	-1.9
	133	1477	-2.0	-2.0
	134	1478	-1.0	-1.0
	135	9480	-2.0	-2.0
	136	1481	-2.0	-2.0
	137	9482	-2.8	-2.4
	138	9483	-1.8	-1.4
	139	1484	-1.0	-1.0

140	1486	-1.0	-1.0
141	1487	-1.0	-1.0
142	1488	-1.0	-1.0
143	1489	-1.0	-1.0
144	1493	-1.0	-1.0
145	1511	-1.0	-1.0
146	1512	-1.0	-1.0
147	1513	-2.8	-2.3
148	1514	-1.8	-1.3
149	1265	4.0	4.0
150	0106	6.1	6.6
151	0089	-1.0	-1.0
152	0230	-1.0	-1.0
153	0231	-1.0	-1.0

Ejemplo 5: Solubilidad de los compuestos de CNP

Para evaluar la idoneidad de los compuestos de CNP para una formulación líquida soluble, se midió la solubilidad de los compuestos de CNP en tampones farmacéuticamente relevantes. Se examinó la solubilidad a dos niveles de pH diferentes (pH 4.0 y pH 6.5) ya que se espera que el pH afecte la solubilidad.

Preparación de muestras a pH 4.0: Las muestras a pH 4.0 de los compuestos de CNP se prepararon mediante la mezcla del péptido secado por congelación con un tampón acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM pH 4.0 a temperatura ambiente a una concentración nominal de al menos 4,000-5,000 nmol/ml. El pH de las muestras se midió y se ajustó a pH 4.0, y las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente hasta el día siguiente si no se habían disuelto completamente.

Preparación de muestras a pH 6.5: Las muestras a pH 6.5 de los compuestos de CNP se prepararon al disolver el péptido secado por congelación en agua. Mientras se agitaba, una parte de la solución peptídica se transfirió a un tampón que consiste de fosfato de sodio 41 mM y glicerol 118 mg/ml, pH 7.5-8.0, seguido de la adición de hidróxido de sodio diluido seguido de otra parte de la solución peptídica y la adicional posterior de hidróxido de sodio diluido. Este procedimiento se repitió hasta que se había añadido toda la solución peptídica, donde se había alcanzado una concentración nominal de al menos 4,000-5,000 nmol/ml y la composición tampón fue fosfato de sodio 8 mM, glicerol 23 mg/ml. El pH de las muestras se midió y se ajustó a pH 6.5, y las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente hasta el día siguiente si no se habían disuelto completamente.

Procedimiento: Las muestras a pH 4.0 se prepararon como se describió anteriormente y se determinó la concentración del compuesto en el sobrenadante mediante el uso de CAD (Método F, CAD02). La concentración del compuesto a pH 4.0 representa la solubilidad a pH 4.0 y los valores medidos se proporcionan en la Tabla 6.

5 Tabla 6: Solubilidad de los compuestos de CNP formulados a pH 4.0

ID del compuesto (ref. quím.)	Solubilidad a pH 4.0 (μM)
1351	6168
1381	8995
1389	8896
1422	8286
1426	11242
9435	7416
1470	6476
1473	5832
1474	6376
1478	6507
9480	23
9482	99
9483	4964
1484	0
1489	5932

Las muestras a pH 6.5 se prepararon como se describió anteriormente y se determinó la concentración del péptido en el sobrenadante mediante CAD (Método F, CAD02). La concentración del péptido a pH 6.5 representa la solubilidad a pH 6.5 y los valores medidos se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7: Solubilidad de formulaciones de los compuestos de CNP a pH 6.5

ID del compuesto	Solubilidad a pH 6.5 (μM)
0745	872
1218	2160
1303	4840
1304	6661
1310	7610
1318	6100
1352	7727
1354	440
1375	3131
1377	443
1378	8923
1379	2674
1382	3175

	9384	7559
	1386	490
	1389	426
	1392	9877
	1402	10021
5	1404	6883
	1406	5670
	9407	6687
	1411	3296 (a pH 5.5)
	1417	1928
	1419	318
	1420	1409
10	1421	857
	1432	9825
	1434	8514
	9435	2356
	1453	7885
	1457	8955
	1470	595
	1473	1764
15	1474	969
	1477	5346
	1478	2177
	9480	6166
	9482	5323
	1484	2332

20 Como regla general, solo las muestras que contenían más de 4,000 μM se sometieron a pruebas adicionales como se describe más abajo.

Estos resultados demuestran que los compuestos de CNP de la presente invención pueden formularse en tampones farmacéuticamente relevantes a concentraciones adecuadas para la administración s.c.

Ejemplo 6: Ensayo de tioflavina T (ThT)

25 El ensayo ThT se usó para evaluar la estabilidad física de los compuestos de CNP y su idoneidad para la formulación líquida. La baja estabilidad física de los péptidos puede conducir a la formación de fibrillas amiloides, que se observan como estructuras macromoleculares similares a hilos bien ordenadas en la muestra, que eventualmente dan como resultado la formación de gel. Esto se ha evaluado tradicionalmente por inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medición

30 es muy subjetiva y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda indicadora de molécula pequeña es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda de este tipo y tiene

una firma de fluorescencia distintiva cuando se une a las fibrillas [Naiki y otros (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 09, 274-284].

Procedimiento: Se añadió tioflavina T a las muestras de sobrenadantes del ejemplo 5 (pH 4.0 y 6.5) mediante el uso de una solución madre acuosa de ThT hasta una concentración final de aproximadamente 1 μ M en las muestras. Las alícuotas de muestras de 150 μ l se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate-96, poliestireno blanco). Usualmente, se aplicaron a la placa de dos a tres réplicas de cada muestra. La placa se selló y se colocó en un lector de placas de fluorescencia (Fluoroskan Ascent FL) y se incubó a 37 °C con agitación orbital (960 rpm; amplitud 1 mm). Las mediciones de la fluorescencia se realizaron cada 20 minutos mediante el uso de excitación mediante un filtro de 444 nm y la medición de la emisión mediante un filtro de 485 nm. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describió anteriormente y el ensayo se finalizó después de 45 horas. Las mediciones de fluorescencia para cada pocillo de la placa de microtitulación se representaron gráficamente frente al tiempo y se estimó el tiempo de retardo (tiempo hasta que se observó un aumento en la fluorescencia de ThT).

Para evaluar la pérdida del péptido disuelto después de 45 h de incubación, la recuperación del péptido se midió como la relación entre el área total del pico después de la incubación frente a antes de la incubación mediante el uso del método RP-UPLC descrito más abajo.

Medición del tiempo de retardo y el % de recuperación del péptido mediante el uso de RP-UPLC: La RP-UPLC se realizó mediante el uso de una columna UPLC Waters Acquity BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 30 mm) (Eluyente A: TFA al 0.1 %v/v en agua; Eluyente B: TFA al 0.1 %v/v en acetonitrilo/agua 4:1) con elución por gradiente (0 min: 95 % A; 2 min: 20 % A; 2.3 min: 20 % A; 2.4 min: 95 % A; 9 min: 95 % A) en un régimen de flujo de 0.9 ml/min y una temperatura de columna de 30 °C. Se usó detección UV a 215 nm para evaluar el área del péptido total.

Las muestras a pH 4.0 se prepararon como se describió en el ejemplo 5 y se sometieron al ensayo ThT como se describió anteriormente. Los valores de tiempo de retardo y de recuperación del péptido se proporcionan en la Tabla 8.

Tabla 8: Tiempo de retardo del ensayo ThT y recuperación del péptido de compuestos de CNP a pH 4.0

ID del compuesto	Tiempo de retardo (h) a pH 4.0	Recuperación del péptido (%) a pH 4.0
1351	45	110
1381	45	112
1422	45	99
1426	0.33	0

1389	45	117
9435	45	111
1473	45	118
1470	45	121
1474	45	161
1478	0.33	3
9483	45	74
1489	45	99

Las muestras a pH 6.5 se prepararon como se describió en el ejemplo 5 y se sometieron al ensayo ThT como se describió anteriormente. Los valores de tiempo de retardo y de recuperación del péptido se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9: Tiempo de retardo del ensayo ThT y recuperación del péptido de compuestos de CNP a pH 6.5

ID del compuesto	Tiempo de retardo (h) a pH 6.5	Recuperación del péptido (%) a pH 6.5
1318	45	105
1218	45	89
1303	5	16
1310	45	117
1375	45	88
1304	45	141
1352	23	0
9384	45	135
9407	45	128
1411	45	112
1417	45	119
1382	45	157
1432	45	188
1434	45	127
1378	2.5	23
1392	45	118
9435	45	99
1402	45	123
1404	45	148
1406	45	120
1453	45	109
1457	45	109
1477	23	16
1478	45	99
9480	45	104
9482	45	93
1484	4	98

En conclusión, este experimento demuestra que la mayoría de los compuestos de CNP de la invención pueden formularse en tampones farmacéuticamente relevantes con baja propensión a la formación de fibrillas.

Ejemplo 7: Medición de proteínas de alto peso molecular (HMWP)

- 5 Para evaluar la propensión de los compuestos de CNP a formar dímeros u oligómeros covalentes cuando se formulan, se determinó el contenido de proteínas de alto peso molecular de las formulaciones de compuestos de CNP a pH 4.0 y 6.5.

Procedimiento: La cantidad relativa de HMWP covalente se evaluó mediante el uso de SEC-UPLC. La SEC-UPLC se realizó mediante el uso de una columna UPLC Waters proteína BEH SEC, 125 Å,
10 4.6 x 150 mm, 1.7 mm, con elución isocrática (NaCl 0.3 M, NaH₂PO₄ 10 mM y H₃PO₄ 5 mM, isopropanol al 50 % (v/v), pH 2.4) con un régimen de flujo de 0.3 ml/min, una temperatura de columna de 50 °C con detección UV a 215 nm. El área total de los picos que eluyen antes del pico principal monomérico se denominó HMWP y se proporcionó en una escala de porcentaje con relación al área total del pico del péptido.

- 15 Resultados: Formación de HMWP después de 2 semanas de incubación en reposo a 37 °C: Las muestras a pH 4.0 se prepararon como se describió en el ejemplo 5 y la cantidad de HMWP se determinó como se describió anteriormente. Las muestras se incubaron durante dos semanas a 37 °C y se determinó nuevamente la cantidad de HMWP. El aumento en HMWP durante dos semanas de incubación a 37 °C se informa en la Tabla 10 (en caso de que el período de incubación se desviara
20 de dos semanas, el aumento en HMWP se normalizó a dos semanas asumiendo una velocidad de formación constante).

Tabla 10: Formación de HMWP en 2 semanas a pH 4.0 (%)

ID del compuesto	% con relación al área total del pico
1351	1.94
1381	0.84
1422	36
1389	1.43
9435	1.07
1473	0.9
1470	1.75
1473	1.26
1474	1.6
1478	1.98
9483	3.0
1489	2.12

Las muestras a pH 6.5 se prepararon como se describió en el ejemplo 5 y la cantidad de HMWP se determinó como se describió anteriormente. Las muestras se incubaron durante dos semanas a 37 °C y se determinó nuevamente la cantidad de HMWP. El aumento en HMWP durante dos semanas de incubación a 37 °C se informa en la Tabla 11 (en caso de que el período de incubación se desviara de dos semanas, el aumento en HMWP se normalizó a dos semanas asumiendo una velocidad de formación constante).

Tabla 11: Formación de HMWP en 2 semanas a pH 6.5 (%)

ID del compuesto	% con relación al área total del pico
1318	1.18
1218	0.43
1310	0.87
1304	1.55
1352	0.82
9384	1.5
9407	12
1411	0.62
1417	3.19
1382	0
1432	2.89
1434	3.2
1378	6.67
1392	0.33
9435	1.93
1402	2.19
1404	1.8
1406	2.77
1453	3.94
1457	3.24
1477	1.83
9480	2.65
9482	1.96

En conclusión, este experimento demuestra que los compuestos de CNP de la invención pueden formularse en tampones farmacéuticamente relevantes con baja propensión a la formación de HMWP.

Ejemplo 8: Estabilidad química acelerada de los compuestos de CNP

Para determinar la estabilidad química de los compuestos de CNP en la formulación, las muestras de compuestos de CNP en tampón se expusieron a degradación química acelerada mediante calentamiento. La estabilidad de un péptido dado se evaluó mediante la medición de la recuperación

del péptido intacto mediante cuantificación por RP-UPLC. Para evaluar la degradación química también se analizaron muestras de patrón mediante LC-MS.

Preparación de la muestra: Las muestras para el estudio de 2 semanas se prepararon de acuerdo con los principios descritos en el ejemplo 5.

- 5 Las muestras para el estudio de 6 semanas se prepararon al disolver el péptido liofilizado en tampón (fosfato 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4) a una concentración de péptido nominal de 5,000 nmol/ml seguido de ajuste del pH con HCl 0.1 N a pH 6.5.

Incubación: Para el estudio de 2 semanas se extrajo una muestra de tiempo cero (TZ) y se almacenó a -18 °C y el volumen restante se incubó a 37 °C. Se extrajeron las muestras y se almacenaron a -18 °C después de 2 semanas de incubación. Las muestras congeladas se descongelaron, se diluyeron a aproximadamente 200 nmol/ml y se determinó el grado de la degradación química mediante el uso de LCMS como se describió.

Para el estudio de 6 semanas se extrajo una muestra de tiempo cero (TZ) y se almacenó a -18 °C y el volumen restante se incubó a 37 °C. Se extrajeron las muestras semanalmente y se almacenaron a -18 °C hasta el último punto temporal de obtención de muestras a las 6 semanas. Las muestras congeladas se descongelaron, se diluyeron a aproximadamente 200 nmol/ml y se determinó el grado de la degradación química mediante el uso de RP-UPLC y LCMS como se describió.

Análisis de la recuperación del péptido mediante RP-UPLC: El método RP-UPLC se realizó en un sistema UPLC Waters ACQUITY H-CLASS equipado con un detector PDA. La separación se llevó a cabo en una columna UPLC ACQUITY BEH C8 (130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 150 mm) que opera a una temperatura de columna de 50 °C con eluyente A (NH₄H₂PO₄ 19.59 mM, (NH₄)₂HPO₄ 41.71 mM, pH 6.5 y MeCN 9:1 v:v) y eluyente B (MeCN al 80 % en agua). La detección por UV se llevó a cabo a 214 nm. El análisis se realizó mediante la inyección de 3 µl de muestra sobre la columna que se eluyó con un gradiente lineal de 1 etapa de los eluyentes A y B de B al 27 a 30 % durante 20 minutos, seguido de un lavado a B al 95 % durante 2 minutos seguido de una fase de reequilibración durante 7 minutos a un régimen de flujo constante de 0.3 ml/min. Esto produjo un tiempo de análisis de 30 minutos por muestra. El área del pico correspondiente al compuesto de CNP intacto se proporcionó en una escala porcentual con relación al área total del pico del péptido.

Análisis de patrones de degradación química mediante LCMS: Las muestras se analizaron en un UPLC VANQUISH de Thermo Scientific, mediante el uso de una columna de fase inversa Waters Acquity C18, 300 Å, partículas de 1.7 µm de 1 mm x 150 mm. Los compuestos se separaron mediante un gradiente lineal del solvente B de 5 % a 55 % durante 48 minutos, mediante el uso del

solvente A: agua, ácido fórmico al 0.1 % con TFA al 0.02 % y el solvente B: acetonitrilo, ácido fórmico al 0.1 % con TFA al 0.02 %. Los espectros de masas se adquirieron mediante un espectrómetro de masas Q Exactive Plus híbrido Cuadrapolo-Orbitrap, opción BioPharma (Thermo Scientific) interconectado con la fuente de iones H-ESI II. Las adquisiciones de datos se realizaron con un intervalo de barrido m/z de 500 a 2,000 y una resolución de 30,000.

La lista de datos se agregó en una tabla sumada de los compuestos. Los encabezados de tabla se definieron de la siguiente manera:

“Recuperación”: Las recuperaciones del pico del compuesto (es decir, la intensidad del pico principal en el tiempo cero que posee la masa monoisotópica de los compuestos) están normalizadas con respecto al pico del compuesto en un punto temporal dado; “Isómeros”: como la intensidad sumada de los picos con masas isobáricas con respecto al compuesto principal, que se segregan en la dimensión RT; “Pérdida de 18 amu”: es decir, la intensidad sumada de los picos con masas 18 amu menores que el pico del compuesto de CNP, que se segregan en la dimensión RT; Fragmentos: la intensidad sumada de los picos con una masa 50 amu menor que el pico del compuesto y los picos con una masa 18 amu mayor que la masa del compuesto, que se segregan en la dimensión RT y se desarrollan con el tiempo y se supone que se derivan de la escisión hidrolítica de la cadena principal del péptido; y finalmente “Otros”: contiene la suma de las intensidades de los picos con una adición de 32 amu o dímeros del pico principal, que se desarrollan con el tiempo.

Resultados: Los resultados del análisis mediante LCMS de un estudio de degradación acelerada de 2 semanas en varios compuestos de CNP de la presente invención se resumen en la Tabla 12. Los resultados del análisis mediante RP-UPLC y LCMS de un estudio de degradación acelerada de 6 semanas en el compuesto de CNP 9482 (Quím. 137) se resumen en la Tabla 13 y la Tabla 14, respectivamente.

Tabla 12: Patrón de degradación química y recuperación de los compuestos de CNP después de 2 semanas de incubación a 37 °C:

Com- puesto	Tampón	Recuperación		Isómeros		Pérdida de 18 amu		Fragmentos		Otros	
		TZ	2S	TZ	2S	TZ	2S	TZ	2S	TZ	2S
9407	fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM pH 6.5	100	98.5	0	1.1	0	0	0	0.7	0.1	0.3
9435	acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4	100	92.9	0	0.6	0	4.1	0	0	0.0	0.0

9480	fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5	100	100.5	0	0	0	0	0	0	0.0	0.6
9482	fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5	100	99.6	0	0	0	0	0	0	0.0	0.3
9483	acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4	100	96.2	0	0	0	0	0	0	0.2	0.6

Tabla 13: Análisis mediante RP-UPLC de la recuperación del péptido del compuesto de CNP [9482] durante 6 semanas:

Compuesto	% con relación al área total del pico						
	TZ	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	5 Semanas	6 Semanas
9482 (Quím. 137)	90.6	89.1	89.1	86.9	85.5	83.5	81.8

Tabla 14: Análisis mediante LCMS del patrón de degradación química y recuperación del compuesto de CNP 9482 (Quím. 137) durante 6 semanas:

Compuesto núm.	Tiempo						
9482	TZ	1S	2S	3S	4S	5S	6S
Recuperación	100.00	100.10	99.50	98.90	95.10	94.70	92.30
Isómeros	0.00	0.00	0.60	1.20	1.70	2.40	3.90
Pérdida de 18 amu	0.00	0.00	0.10	0.10	0.20	0.20	0.30
Fragmentos	0.00	0.20	0.30	0.50	0.90	0.80	1.20
Otros	0.20	0.30	0.30	0.30	0.50	0.40	0.50

Estos datos muestran que un compuesto de CNP de acuerdo con la presente invención muestra una estabilidad química sustancial en la formulación.

Ejemplo 9: Tolerancia local de los compuestos de CNP en ratas

El propósito de este estudio fue evaluar la reacción tisular local a la inyección subcutánea de los compuestos de CNP en ratas.

Procedimiento: Los compuestos de CNP se formularon de acuerdo con los principios descritos en Métodos generales de preparación - Método G. A cada rata Sprague Dawley (machos, 10-11 semanas de edad a su llegada, Janvier, Francia) se le administró s.c. con 250 o 350 ul del mismo compuesto (concentración de la formulación de 1,000 nmol/ml) 120 h antes de la recolección de tejido, lo que

dio como resultado un total de dos inyecciones para cada animal (Tabla 15). El sitio de inyección (flanco o cuello) se alternó entre animales dentro de cada grupo y punto temporal.

Tabla 15: Cronología experimental para el estudio de tolerancia local en ratas

Punto temporal	Actividad del estudio
Día 0	Rasurado (por ejemplo, cuello) seguido de la 1ª dosis en la zona rasurada
Día 3	Rasurado (por ejemplo, flanco)
Día 4	2ª dosis en el área rasurada (por ejemplo, flanco)
Día 5	Observación de la piel, recolección de tejidos y finalización

Los animales tenían acceso a agua del grifo y a alimentos (Altromin 1324) ad libitum. El tamaño del grupo fue $n = 3$ para los vehículos y control positivo, y $n = 4$ para los compuestos de prueba. Los vehículos y compuestos se formularon en acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4.0 o en fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4, como se muestra en la Tabla 16.

Los animales se anestesiaron con isoflurano. Por medio de una máquina de rasurar eléctrica, se retiró un área cuadrada de pelaje (2 cm x 2 cm) ya sea del cuello de las ratas o del área del flanco). Para la administración, se colocó una aguja de inyección nueva (cánula de 25G, jeringa de 1 ml) en el medio del borde del cuadrado más cercano a la cabeza del animal y la aguja se insertó en la piel desde el borde hacia el centro del cuadrado. Por tanto, la punta de la aguja se ubica en el centro del cuadrado, la ubicación se marca con una pluma permanente y la formulación se inserta en el centro del cuadrado. El día de la recolección de tejidos, las ratas se anestesiaron profundamente con isoflurano y se les practicó la eutanasia por exanguinación. Los sitios de inyección se inspeccionaron y puntuaron con respecto a las lesiones patológicas. Se evaluaron los sitios de inyección y se registró cualquier cambio (ubicación, color, forma y tamaño) y se obtuvieron muestras para la preparación para histología.

Los sitios de inyección se retiraron y fijaron en formaldehído neutro tamponado con fosfato al 4 % en contenedores plásticos sellados.

Cada sitio de inyección se cortó subsecuentemente en tres secciones a 0.8 cm, 1.0 cm y 1.2 cm del borde del cuadrado donde se colocó la aguja de inyección y, respectivamente, estas secciones representaban los sitios de inyección y el tejido adyacente. El tejido se procesó, se embebió en parafina y se cortó en secciones finas de 2-4 μm , se tiñó con hematoxilina y eosina (HyE), y se evaluó microscópicamente con un microscopio óptico. Los cambios histopatológicos se clasificaron en una escala de 5 niveles (Mínimo (Mín), Leve (Lev), Moderado (Mod), Marcado (Mar) y Grave (Grav)). Los estudios se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16 - Descripción general del compuesto, punto temporal para la obtención de muestras y formulaciones

ID del compuesto	Volumen de administración	Punto temporal para la obtención de muestras (días después de la inyección)	Formulaciones
1351	350 µl	5	pH=4.01; compuesto 1351, 947 nmol/ml; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM
9384	350 µl	5	pH=7.39; 9384, 1,032 nmol/ml; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM
9407	350 µl	5	pH=7.40; 9407, 1,046 nmol/ml; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM
1420	350 µl	5	pH=3.98; compuesto 1420, 1,021 nmol/ml; acetato 5 mM; glicerol 250 mM
Control inactivo: 1265	350 µl	5	pH=4; 1265 1,042 nmol/ml; acetato 5 mM; glicerol 250 mM
Control de carga neta positiva: 0776	250 µl	5	pH=4.02; 0776, 4,417 nmol/ml; acetato 5 mM; propilenglicol 240 mM
	350 µl	5	pH=4.02; compuesto 0776, 1,019 nmol/ml; acetato 5 mM; glicerol 250 mM

Resultados: Los resultados del estudio de tolerancia local se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17: Gravedad e incidencia de reacciones subcutáneas locales* 4 o 5 días después de la inyección de los diferentes compuestos en ratas.

ID del compuesto	Número de sitios de inyección evaluados	Número de inyecciones por gravedad de la necrosis					
Grado de gravedad		NAD **	Mín.	Lev.	Mod.	Mar.	Grav.
1351	4	4					
9384	4	4					
9407	4	4					
1420	4	3		1			

1265	2					2	
Control de carga neta positiva: 0776	3					3	
	3				1	2	

- 5 * La necrosis se utilizó como marcador para las reacciones subcutáneas locales; **NAD = No se detectaron anomalías

Conclusiones: El control de carga neta positiva 0776 mostró necrosis subcutánea local de moderada a marcada 5 días después de las inyecciones subcutáneas en la rata.

- 10 En comparación, los compuestos 1351, 9384, 9407 y 1420 no mostraron necrosis subcutánea local o sólo leve 5 días después de las inyecciones subcutáneas en la rata y todos se evaluaron como aceptables para la administración subcutánea en humanos.

Ejemplo 10: Estudio de tolerancia local de CNP en cerdos LYD

- 15 El propósito de este estudio fue evaluar la respuesta de reacción tisular local a la inyección subcutánea de los compuestos de CNP en cerdos.

Procedimiento: En cerdos domésticos, el sitio de inyección se sometió a un examen histopatológico después de la administración subcutánea. Las inyecciones se colocaron a mitad del lomo entre el hombro y la cadera a ambos lados de la línea media dorsal, y uno o dos días antes de que los sitios de inyección de 2x2 cm se rasuraran y marcaran con tinta permanente bajo anestesia ligera.

- 20 Cada inyección consistió en 100 o 200 µl de formulación con una concentración de aproximadamente 4400 µM. Las formulaciones de los compuestos de CNP se prepararon de acuerdo con los principios en Métodos generales de preparación - Método G, y fueron A) fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5, B) acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4.0 o C) acetato de sodio 5 mM, propilenglicol 240 mM, pH 4.0 y se incluyó solución salina fisiológica como control
- 25 negativo.

El día 1, los cerdos se anestesiaron ligeramente. Se usaron una pluma de insulina (NovoPen 4) y una aguja de insulina (NovoTwist 32G/5 mm) para el depósito preciso de las formulaciones de CNP en el tejido graso subcutáneo con la aguja perpendicular a la piel.

- 30 El día 5 (4 días después de la inyección) o 6 (5 días después de la inyección), a los cerdos se les practicó la eutanasia y los sitios de inyección se retiraron y fijaron en formaldehído neutro tamponado con fosfato al 4 % en contenedores plásticos sellados. Los bloques de tejido se prefijaron durante 2-4 horas en formol tamponado al 10 %, se cortaron en porciones de 2 mm de grosor con

una cuchilla múltiple, se examinaron para determinar los cambios macroscópicos y finalmente se fijaron durante toda la noche en casetes. Se seleccionaron dos porciones de tejido para una evaluación con microscopio óptico donde la reacción tisular fue máxima o alternativamente en la parte central del sitio de inyección. Se cortaron de tres a cuatro secciones de 2-4 μm de tres niveles a una distancia de 100 μm , se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE) y se evaluaron en un microscopio óptico. Los cambios histopatológicos se clasificaron en una escala de 5 niveles ((Mínimo (Mín), Leve (Lev), Moderado (Mod), Marcado (Mar) y Grave (Grav)). Los estudios se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18: Descripción general del compuesto, punto temporal para la obtención de muestras y las formulaciones:

ID del compuesto	Punto temporal para la obtención de muestras (días después de la inyección)	Formulaciones
9384	5	pH=6.57; compuesto 9384, 3,988 μM ; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM (A)
9407	5	pH=6.50; compuesto 9407, 4,343 μM ; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM (A)
9435	5	pH=4.00; compuesto 9435, 4,362 μM ; acetato 5 mM; glicerol 250 mM (B)
9480	4	pH=6.46; compuesto 9480, 4,362 μM ; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM (A)
9482	4	pH=6.49; compuesto 9482, 4,383 μM ; fosfato 8 mM; glicerol 250 mM (A)
9483	4	pH=3.96; compuesto 9483, 4,385 μM ; acetato 5 mM; glicerol 250 mM (B)
0106	5	pH=5.5; compuesto 0106 4,321 μM ; monohidrato de ácido cítrico 1.33 mM; citrato 3.67 mM, trisódico; trehalosa 52 mg/ml; manosa D 15 mg/ml; L-metionina 0.73 mg/ml; polisorbato 80 0.05 mg/ml
Control de carga neta positiva: 0776	5	pH=4.02; compuesto 0776, 4,157 μM ; acetato 5 mM; propilenglicol 240 mM (C)
Control de carga neta positiva: 1235	5	pH=4.05; compuesto 1235, 4,528 μM ; acetato 5 mM; glicerol 250 mM (B)

Resultados: Los resultados se resumen en la Tabla 19. * La necrosis se utilizó como marcador para las reacciones subcutáneas locales; **NAD: No se detectaron anomalías

Tabla 19: Gravedad e incidencia de reacciones subcutáneas locales 4 o 5 días después de la inyección de los diferentes compuestos en cerdos:

ID del compuesto	Número de sitios de inyección evaluados	Número de inyecciones por gravedad de la necrosis					
Grado de gravedad		NAD *	Mín.	Lev.	Mod.	Mar.	Grav .
9384	4	3	1				
9407	4	3	1				
9435	4		3	1			
9480	4	4					
9482	4	4					
9483	4	2		1	1		
0106	4	4					
Control de carga neta positiva: 0776	4				1	3	
Control de carga neta débilmente positiva: 1235	4		2	2			

En conclusión, el compuesto de control de carga neta positiva 0776 mostró necrosis subcutánea local de moderada a marcada 5 días después de las inyecciones subcutáneas en el cerdo, mientras que el péptido CNP 0106 con carga neta positiva sin un aglutinante de albúmina de ácido graso unido no muestra reacciones observables en el sitio de inyección.

En comparación, los compuestos 9480 y 9482 no mostraron necrosis subcutánea local 5 días después de las inyecciones subcutáneas en el cerdo; los compuestos 9384 y los compuestos 9407 mostraron necrosis subcutánea local de nula a mínima 5 días después de las inyecciones subcutáneas en el cerdo; los compuestos 9435 y 1235 mostraron necrosis subcutánea local de mínima a leve 5 días después de las inyecciones subcutáneas en el cerdo, y el compuesto 9483 mostró necrosis subcutánea local de nula a moderada 5 días después de las inyecciones subcutáneas en el cerdo. Los compuestos 9384, 9407, 9435, 9480 y 9482 se evaluaron todos como aceptables para la administración subcutánea en humanos.

Ejemplo 11: PK/PD de los compuestos de CNP después de la administración i.v. y s.c. a ratas

Para evaluar el perfil PK/PD por vía i.v. y s.c. de los compuestos de CNP de la presente invención, las formulaciones de los compuestos de CNP se administraron a ratas, se tomaron muestras de sangre y se midió la exposición y la respuesta de GMPc.

- 5 Ensayo con el biomarcador GMPc: La actividad biológica de los compuestos de CNP *in vivo* se evaluó mediante la medición de GMPc en muestras de plasma mediante precipitación de proteínas plasmáticas seguido de la cuantificación con LC-MS/MS.

Para evaluar la respuesta del biomarcador monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en muestras biológicas, después de la administración de los compuestos de CNP a los animales del estudio, se aplicó un procedimiento de precipitación de proteínas plasmáticas, seguido de cromatografía líquida con análisis espectrométrico de masas en tándem (LC-MS/MS). En principio, la concentración de GMPc en las muestras de plasma del estudio, se determinó mediante el uso de una curva estándar preparada con un analito sustituto estable marcado con isótopo (SIL) ($^{13}\text{C}_{10}$ $^{15}\text{N}_5$ GMPc) como referencia. El analito sustituto se añadió en una matriz de blanco auténtica agrupada para cubrir un intervalo analítico de 5 nM – 2,000 nM. Se usó 8-metoximetil-3-isobutil 1-metilxantina (MMPX) como estándar interno. El procedimiento de precipitación de proteínas plasmáticas se realizó mediante el uso de un solvente orgánico para precipitar la proteína plasmática, dejando un sobrenadante que contenía las moléculas de GMPc que luego se analizarían en el instrumento LC-MS/MS.

20 Para preparar las muestras estándar, se descongeló la matriz de plasma de blanco auténtica congelada y subsecuentemente se centrifugó durante 5 min a 4,000 RPM, a 4 °C. Se usó una solución madre de SIL-GMPc para preparar un estándar de 2,000 nM en plasma de blanco, que después se transfiere a una placa de 96 pocillos Eppendorf de 1 ml (Pat. 8,636,965). Esto se colocó en un manipulador de líquidos (TECAN Fluent 78) para preparar los estándares y los QC (5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 nM) mediante dilución en serie en plasma de blanco en una microplaca de 96 pocillos (Chimney Well 651201). Se prepararon muestras de plasma de blanco en la misma placa. Las muestras del estudio se descongelaron por ventilación durante 10 min a temperatura ambiente, se agitaron en un agitador de mesa durante 5 min a temperatura ambiente y subsecuentemente se centrifugaron durante 5 min a 4,000 RPM a 4 °C. Las muestras se colocaron a continuación en el manipulador de líquidos para realizar el procedimiento de precipitación de proteínas plasmáticas. Se precipitó un volumen de estándares, QC, cero y muestras de estudio con 4 volúmenes de acetonitrilo (OPTIMA® grado LC/MS) que contenía 30 nM de MMPX (Sigma #M2547). A continuación, las

muestras se agitaron en un agitador de mesa durante 4 min a temperatura ambiente, y subsecuentemente, se centrifugaron durante 30 min, a 4,000 RPM a 4 °C, después de lo cual el sobrenadante se transfirió a una nueva microplaca de 96 pocillos. Las placas se evaporaron subsecuentemente mediante el uso de un concentrador Eppendorf plus™ durante 60 min a 30 °C.

5 Los residuos se reconstituyeron en un volumen de acetonitrilo al 5 % y ácido fórmico al 0.1 % (RATHBURN grado LC/MS), se agitaron en un agitador de mesa durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 min a 4 °C. Las muestras preparadas se analizaron a continuación en un instrumento LC-MS/MS (Sciex ExionLC™ acoplado a un cuadrupolo triple Sciex 6500+). La elución por gradiente se aplicó en la LC de fase inversa, mediante el uso de ácido fórmico al 0.1 % como fase móvil A y acetonitrilo al 95 % y ácido fórmico al 0.1 % como fase móvil B. Se usó una columna UPLC Waters Acquity® CSH™ Fluoro-fenil 1.7 µm, 2.1 x 100 mm como fase estacionaria y se termorreguló a 60 °C. Las SIL-GMPc, GMPc endógenas y MMPX se detectaron en la MS/MS en modo de ion positivo mediante monitoreo selectivo de la reacción.

15 Criterios de aceptación para la ejecución analítica: La curva estándar de SIL-GMPc se estableció con una ponderación 1/x² y se evaluó en términos de linealidad, precisión y exactitud. Al menos el 75 % de los estándares de calibración tenían que cumplir los siguientes criterios cuando se calcularon de forma retrospectiva: Los estándares de calibración tenían que estar dentro de ± 15 % de la concentración nominal de los estándares de calibración respectivos, excepto por LLOQ que tenía que estar dentro de ± 20 % de la concentración nominal de los estándares de LLOQ. Los valores que
20 estén fuera de estos límites deben desecharse siempre y cuando no cambien el modelo establecido. Si descartar un estándar de calibración dio como resultado que otro estándar de calibración estuviera fuera de los límites, entonces también se desechó este estándar de calibración.

Al menos dos tercios de las muestras de QC tenían que estar dentro del 15 % de sus valores nominales respectivos. Un tercio de las muestras de QC pudiera estar fuera del 15 % de su valor nominal
25 respectivo, pero nunca más del 50 % de las muestras de QC a la misma concentración nominal.

Análisis en plasma cuantitativo de los compuestos de CNP: La evaluación de las concentraciones plasmáticas de los compuestos de CNP se realizó mediante precipitación de proteínas plasmáticas y se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Los calibradores se prepararon mediante la adición de plasma blanco de rata o minicerdo con el compuesto de CNP
30 relevante en el intervalo de 0.5 a 2,000 nM. Los calibradores, los blancos de plasma o las muestras del estudio se prepararon para TF-LC-MS mediante precipitación de proteínas mediante la adición de tres o cuatro volúmenes de etanol o metanol que contenían 20 nM de estándar interno a un

volumen de muestra. Para algunos compuestos, se añadió ácido fórmico al reactivo de precipitación (la concentración final fue 1 % v/v). Después de la adición del reactivo de precipitación, la mezcla se centrifugó a 6,200 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Después de la centrifugación, se mezcló un volumen de sobrenadante con dos volúmenes de agua (con ácido fórmico al 1 %). La mezcla se

5 analizó mediante TF-LC-MS mediante el uso de una columna de turboflujo Cyclone (0.5 x 50 mm, ThermoFisher Scientific) y una columna analítica XBridge proteína BEH C4 3.5 µm 300 Å o XBridge proteína BEH C18 3.5 µm 130 Å (ambas eran de 50 x 2.1 mm y se obtuvieron de Waters). Se realizó una elución por gradiente mediante el uso de la fase móvil A (que consiste de agua milli-Q con ácido fórmico al 1 % y metanol/acetonitrilo al 5 % (50/50)) y fase móvil B (que consiste de

10 metanol/acetonitrilo (50/50) con ácido fórmico al 1 % y agua milli-Q al 5 %). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de ionización positiva. Se usó un espectrómetro de masas TSQ Altis (ThermoFisher Scientific) como detector en el modo de monitoreo de la reacción seleccionado (la transición específica se optimizó para cada compuesto de CNP). Se usaron curvas de calibración lineales (pesadas 1/x²) para calcular la concentración en las muestras de plasma. Se incluyeron

15 muestras de control de calidad. La desviación entre la concentración nominal y la calculada en los calibradores y las muestras de control de calidad estuvo más abajo del 15 %.

Animales y administración: Grupos de 4-6 ratas (machos, Sprague Dawley, 350 g a su llegada, Janvier, Francia) por compuesto y vía de administración se administraron con un compuesto de CNP formulado en A) fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, polisorbato 20 al 0.007 %, pH 7.4 o B)

20 acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, polisorbato 20 al 0.007 %, pH 4.0, en dependencia del compuesto respectivo. La dosis s.c. fue 300 nmol/kg, a una concentración de 1,000 nmol/l, que dio como resultado un volumen de administración de dosis de 0.3 ml/kg, mientras que la dosis i.v. fue 100 nmol/kg, a una concentración de 100 nmol/l, que dio como resultado un volumen de administración de 1 ml/kg.

25 Obtención de muestras: Se recolectaron muestras de sangre sublinguales de 250 µl de ratas no anestesiadas en viales recubiertos con EDTA (Microvette 600K3E # ref. 15.1673.100 Sarstedt) al inicio (-1 h antes de la administración) así como también 5 min (solo grupos administrados i.v.), 2 h, 6 h, 24 h, 48 h y 72 h (solo para el análisis de exposición) después de la administración. Las muestras de sangre se almacenaron rápidamente en hielo y se centrifugaron (4 °C, 8,000 RPM, 5

30 min) dentro de los 10 minutos después de la recolección. Muestras de plasma de 50 µl se transfirieron a cada tubo micronic para el análisis de exposición o de GMPc, se mantuvieron en hielo seco y se

almacenaron en un congelador (-20 °C). Las ratas tenían acceso a alimentos (Altromin) y agua del grifo ad libitum.

Análisis: Los parámetros de PK se calcularon mediante análisis no compartimental (NCA) mediante el uso del software Phoenix WinNonlin (ver. 8.1 o posterior, Certara) para cada animal. El aclaramiento (Cl) se calculó como: Dosis / AUCinf (lineal hacia arriba, logarítmica hacia abajo). La semivida ($t_{1/2}$) se calculó como $\ln(2) / \lambda$ donde λ se calculó mediante regresión lineal de tiempo frente a logaritmo de la concentración, típicamente en un intervalo de tiempo entre 2 a 48 horas (por ejemplo, de 6 a 48 horas). La biodisponibilidad se calculó como AUC normalizada a la dosis: $(AUC(sc) / Dosis(sc)) / (AUC(iv) / Dosis(iv))$. Los valores en la tabla son medias a partir de animales individuales (n = 4-6 animales individuales). Los gráficos posteriores para la concentración plasmática de GMPc frente al tiempo son la concentración media de GMPc (eje Y) (n = 4-6 animales individuales) después de la administración de la dosis iv y el tiempo de obtención de muestras de plasma nominal (eje X).

Resultados: Los datos de PK con aclaramiento (CL), $T_{1/2}$ de semivida y biodisponibilidad (F%) se resumen en la Tabla 20. Las concentraciones plasmáticas de GMPc después de la administración i.v. de compuestos de CNP se muestran en las Figuras 1-27, la dosis se muestra en la Tabla 20. Los GMPc plasmáticos se informan como la media.

Tabla 20: Perfil farmacocinético de compuestos de CNP administrados i.v. o s.c. en ratas

	administración i.v.			administración s.c.		
ID del compuesto	Dosis (nmol/kg)	Cl (l/h/kg)	$T_{1/2}$ (h)	Dosis (nmol/kg)	$T_{1/2}$ (h)	F (%)
1225	91	0.0103	5.03	286	5.1	61.2
1227	102	0.0168	3.56	n.d.	n.d.	n.d.
1233	101	0.0246	1.42	287	3.57	33.8
1241	92	0.0164	2.78	n.d.	n.d.	n.d.
1351	102	0.0093	6.07	n.d.	n.d.	n.d.
1352	102	0.0102	6.34	n.d.	n.d.	n.d.
1354	100	0.00652	7.56	n.d.	n.d.	n.d.
1356	102	0.0141	3.47	n.d.	n.d.	n.d.
1375	100	0.0057	9.66	n.d.	n.d.	n.d.
1376	103	0.00418	9.55	n.d.	n.d.	n.d.
1377	94	0.00747	6.29	n.d.	n.d.	n.d.
1378	100	0.00926	5.29	n.d.	n.d.	n.d.
1379	90	0.0051	9.8	n.d.	n.d.	n.d.
1381	94	0.00382	15.2	n.d.	n.d.	n.d.

9384	99	0.00493	9.15	306	9.47	49.7
1386	91	0.00605	8.16	n.d.	n.d.	n.d.
1389	95	0.00415	14.6	n.d.	n.d.	n.d.
1392	95	0.00799	5.72	n.d.	n.d.	n.d.
9407	94.2	0.00515	15.2	309	14.9	37.2
1420	100	0.00764	8.34	306	9.47	49.7
1426	94	0.00348	9.96	n.d.	n.d.	n.d.
1434	100	0.00764	8.34	n.d.	n.d.	n.d.
9435	93	0.00458	10.4	n.d.	n.d.	n.d.
9482	102	0.00549	14.5	323	18.6	71.5
0312	99.8	0.00738	9.4	300	8.24	20.2
0776	100	0.00613	10.7	267	5.63	7.35
1235	93.9	0.0115	6.2	329	6.28	65.8

En conclusión, este experimento muestra que los compuestos de CNP de la presente invención muestran semividas prolongadas y una reducción del aclaramiento en un modelo de rata *in vivo*. Además, el experimento muestra que los compuestos de CNP son biológicamente activos en base a su capacidad para provocar una respuesta de GMPc en los animales administrados (Figuras 1-27).

Ejemplo 12: PK/PD de los compuestos de CNP después de la administración i.v. y s.c. a minicerdos y cerdos LYD

El propósito de este estudio fue investigar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas después de la administración intravenosa (i.v.) y subcutánea (s.c.) a minicerdos Göttingen y cerdos LYD domésticos, y estimar la biodisponibilidad después de la administración s.c. El análisis plasmático cuantitativo de los niveles de CNP y GMPc se realizó como se describió en el ejemplo 11.

Animales y administración: Los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en minicerdos Göttingen o cerdos LYD domésticos se realizaron en el CRO Minerva Imaging o Novo Nordisk A/S, respectivamente. Los compuestos de CNP se administraron a hembras normales 1) minicerdos Göttingen de 6-12 meses de edad con un peso promedio de 22 kg o 2) cerdos LYD domésticos de 4-5 meses de edad con un peso promedio de 80 kg. Al menos una semana antes de la administración, se implantaron catéteres venosos centrales permanentes para la obtención de muestras de sangre y la administración intravenosa (i.v.). Para la administración subcutánea (s.c.), se realizó el escaneo por ultrasonido de los cerdos y el área de inyección óptima lateralmente en el cuello se marcó mediante un tatuaje permanente. Se usaron una pluma de insulina (NovoPen Echo o NovoPen 4) y una aguja de insulina (NovoFine 32G/4 mm o NovoTwist 32G/5 mm) para el depósito preciso de las formulaciones de CNP en el tejido graso subcutáneo con la aguja perpendicular a la piel.

Los compuestos de CNP se formularon de acuerdo con los principios en Métodos generales de preparación - Método G y fueron A) fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 6.5, B) acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4.0, C) acetato de sodio 5 mM, propilenglicol 240 mM, pH=4.0, D) fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.5 o E) fosfato de sodio 20 mM, propilenglicol 223 mM, pH 6.0.

Por vía intravenosa, los compuestos de CNP se administraron a 30-60 nmol/kg a minicerdos y 15-43 nmol/kg a cerdos domésticos mediante el uso de las formulaciones A-E. Por vía subcutánea, los compuestos de CNP se administraron a 55-62 nmol/kg a minicerdos y 20-30 nmol/kg a cerdos domésticos mediante el uso de las formulaciones A-D.

Obtención de muestras: Se recolectaron muestras de sangre de aproximadamente 1 ml antes de la dosis y hasta 14 días después de la dosis en tubos recubiertos con EDTA (8 mM) para el análisis de GMPc y compuestos de CNP mediante LC-MS. En pocos casos, GMPc solo se analizó hasta 48 horas después de la dosis después de la administración intravenosa en cerdos LYD domésticos. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo húmedo durante un máximo de 30 minutos hasta la centrifugación durante 10 minutos a 4 °C y un mínimo de 1,500 G, y las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis PK no compartimental mediante el uso de Phoenix WinNonlin 8.1, Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE. UU. El cálculo del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) se basó en el método de “lineal hacia arriba, logarítmica hacia abajo”, y se usó una ponderación uniforme para estimar la constante de velocidad terminal (λ_z). La biodisponibilidad s.c. (F) se calculó como el AUC normalizado a la dosis (AUC/dosis) después de la administración s.c. dividido por el AUC/dosis después de la administración i.v.

Resultados: Los datos de PK con el aclaramiento (CL), $T_{1/2}$ de semivida y biodisponibilidad (F%) en minicerdos se resumen en la Tabla 21. Los datos de PK con aclaramiento (CL), $T_{1/2}$ de semivida y biodisponibilidad (F%) en cerdos LYD domésticos se resumen en la Tabla 22. Las concentraciones plasmáticas de GMPc después de la administración i.v. o s.c. de los compuestos de CNP en minicerdos y cerdos domésticos se muestran en las Figuras 28-48, la dosis se muestra en las Tablas 21 y 22. Los GMPc plasmáticos se informan como la media de n=2-4 durante 14 días en minicerdos y la media de n=2-4 durante 2 días en cerdos LYD domésticos.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos después de la administración i.v. y s.c. de los compuestos de CNP a minicerdos Göttingen:

ID del compuesto	Minicerdo Göttingen							
	PK intravenosa				PK subcutánea			
	Dosis (nmol/kg)	n	CL (ml/h/kg)	T _{1/2} ,iv (h)	Dosis (nmol/kg)	n	T _{1/2} , sc (h)	F (%)
9384	60	3	1.53	61	60	3	61	78
9407	62	3	1.20	82	60	3	92	86
9435	55	4	1.02	77	60	4	82	77
9480	60	3	1.13	74	45	3	67	87
9482	60	4	1.07	89	45	3	84	89
9483	60	3	1.04	88	60	3	75	44
0312	30	3	0.927	71	60	3	36	10
0776	30	3	0.841	60	60	3	56	13

Tabla 22: Parámetros farmacocinéticos después de la administración i.v. y s.c. de los compuestos de CNP a cerdos LYD domésticos:

ID del compuesto	Cerdo LYD doméstico							
	PK intravenosa				PK subcutánea			
	Dosis (nmol/kg)	n	CL (ml/h/kg)	T _{1/2} ,iv (h)	Dosis (nmol/kg)	n	T _{1/2} , sc (h)	F (%)
1225	43	2	3.23	15				
1227	43	2	5.54	11	20	3	9	55
0312	15	3	1.60	32	30	3	29	11
0776	15	4	1.34	29	30	3	41	7
1235	43	2	3.28	20	20	2	29	25

Semivida (T_{1/2}) y biodisponibilidad s.c. (F) proporcionadas como media en la Tabla 21 y 22.

Conclusión: este experimento muestra que los compuestos de CNP de la presente invención muestran semividas prolongadas y una reducción del aclaramiento tanto en minicerdos como en cerdos LYD domésticos. Además, el experimento muestra que los compuestos de CNP son biológicamente activos en base a su capacidad para provocar una respuesta de GMPC en los animales administrados (Figuras 28-48).

Además, el experimento muestra biodisponibilidades (F) subcutáneas (Tabla 21 y 22) por encima del 40 % para los compuestos de la invención. Mientras que los ejemplos con carga positiva que no funcionan (Compuestos ID 0776 y 0312) muestran bajas biodisponibilidades subcutáneas (7-13 %). El ejemplo que no funciona (Compuesto ID 1235) con una carga aproximadamente neutra muestra una biodisponibilidad subcutánea media del 25 %.

Ejemplo 13: Medición telemétrica de la frecuencia cardiaca y la presión arterial

El propósito del estudio fue investigar el efecto de la administración aguda con el compuesto de CNP 9482 (Quím. 137) sobre la presión arterial media (MAP) y la frecuencia cardiaca (HR) en ratas despiertas.

Procedimiento: Los transductores se implantan en ratas Sprague Dawley (Charles River) y a las ratas se les permite un período de recuperación de 2–3 semanas. Antes de la cirugía, los dispositivos se registran en el software mediante su colocación en una placa receptora y se encendieron. Se añade solución salina estéril al catéter del transductor antes de iniciar la cirugía y, a continuación, se enciende el transmisor. Los transmisores se colocan en el abdomen con el sensor en la aorta abdominal. Se usa isoflurano como anestésico, y durante y después de la cirugía, las ratas reciben Temgesic (0.05 mg/kg s.c.), Norodyl (5 mg/kg s.c.) y Baytril (10 mg/kg s.c.) para alivio del dolor y para prevenir la infección bacteriana.

Diseño del estudio: Las ratas se alojan 2/caja (1 con el dispositivo y 1 como pareja social). Todos los animales tendrán acceso libre al agua y al alimento (altromin) durante todo el estudio. Las ratas se alojarán en ciclos de luz con luz de 6 AM a 6 PM y oscuridad de 6 PM a 6 AM. Ocho ratas se dividen en 2 grupos de acuerdo con un diseño de estudio cruzado.

Telemetría: Cada rata está equipada con un transductor (HD-S10 de DSI) capaz de medir la presión arterial, la frecuencia cardiaca y la actividad mediante el uso del software Ponemah con una frecuencia de 100 Hz. Durante las mediciones, no debe haber perturbaciones en la habitación en la que se alojan las ratas para minimizar la variabilidad en los datos. Se realizará un registro inicial de 4 horas antes del inicio del estudio para capturar los patrones de presión arterial media (MAP) y frecuencia cardiaca (HR) en ratas no tratadas y sin perturbar. El periodo de registro después de la administración del fármaco fue de 24 horas.

Esquema de administración: Las ratas se administran en un diseño de estudio cruzado con 4 ratas en cada grupo. A cada rata se le proporciona un período de reposo farmacológico de 1 semana antes del siguiente evento de administración. La administración será intravenosa (i.v.) en la vena de la cola. La administración de 9482 se sometió a prueba en 30, 100 y 300 nmol/kg i.v. en experimentos separados. El vehículo consiste de fosfato 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4.

El análisis de datos y la estadística se realizó en el software Ponemah y Graphpad prism. Para la estadística, se aplicó una prueba t pareada con un nivel de confianza del 95 % y $P < 0.05$ que denota la significación estadística.

Resultados: Dentro de los primeros 30 min después de la administración, no se observó diferencia en MAP y HR con 30, 100 o 300 nmol/kg del compuesto de CNP 9482 en comparación con el

vehículo (Tabla 23 y Tabla 25). Un promedio de las primeras 12 h no dio como resultado diferencias en MAP entre el vehículo y las tres dosis sometidas a prueba de 9482 (Tabla 24). Se detectó un aumento ($P<0.05$) de $8.8\pm 10.1\%$ y $6.4\pm 6.6\%$ en la HR en el mismo periodo con 100 y 300 nmol/kg (Tabla 26). No se observó ningún cambio en la HR con una dosis de 30 nmol/kg (Tabla 26).

5 Tabla 23: Presión arterial media: 30 min

	Vehículo		9482		
Dosis (nmol/kg)	Media (mmHg)	SD	Media (mmHg)	SD	<i>P</i>
30	117	13	116	15	ns
100	113	7	114	6	ns
300	111	8	111	8	ns

10 Tabla 24: Presión arterial media: 12 h

	Vehículo		9482		
Dosis (nmol/kg)	Media (mmHg)	SD	Media (mmHg)	SD	<i>P</i>
30	108	14	106	10	ns
100	104	7	104	7	ns
300	103	5	102	6	ns

15 Tabla 25: Frecuencia cardiaca: 30 min

	Vehículo		9482		
Dosis (nmol/kg)	Media (lpm)	SD	Media (lpm)	SD	<i>P</i>
30	366	26	356	24	ns
100	382	19	388	12	ns
300	379	18	370	18	ns

20 Tabla 26: Frecuencia cardiaca: 12 h

	Vehículo		9482		
Dosis (nmol/kg)	Media (lpm)	SD	Media (lpm)	SD	<i>P</i>
30	311	13	332	27	ns
100	335	15	364	28	0.04
300	334	15	355	15	0.03

25 Conclusión: La infusión IV. aguda del compuesto de CNP 9482 no se asoció con ningún cambio hemodinámico importante durante un periodo de 12 h, como lo demuestran las MAP no alteradas y solo aumentos menores en la HR a las dos dosis más altas.

Ejemplo 14: Disección y cultivo de hueso metatarsiano de ratón:

El propósito de este estudio fue evaluar el crecimiento óseo después de la administración de los compuestos de CNP en un modelo de ratón *ex vivo*.

Procedimiento: A crías de ratón de un día de edad (NTM, Javier Labs, Francia) se les practicó la eutanasia antes de la disección. Se siguieron todas las directrices internacionales e internas de Novo Nordisk aplicables de cuidado y uso de animales. Los tres huesos metatarsianos medios se diseccionaron de cada pata trasera. Los huesos diseccionados se colocaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos y se cultivaron en 400 µl de medio esencial mínimo α suplementado con BSA al 0.2 %, Pen/Estrep al 1 % a 37 °C y 5 % de CO₂. Los huesos de todos los animales se aleatorizaron en un grupo de control y seis grupos tratados con los compuestos de CNP (100 nM; n=8). El medio se cambió cada 2-3 días. Todos los compuestos se formularon de acuerdo con los principios descritos en Métodos generales de preparación - Método G. Los compuestos 9435 y 9483 se formularon en A) acetato de sodio 5 mM, glicerol 250 mM, pH 4.0 mientras que los compuestos 9384, 9407, 9480 y 9482 se formularon en B) fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, pH 7.4.

El vehículo solo no afectó el crecimiento óseo en comparación con el medio solo.

Las imágenes digitales se capturaron los días 0, 4, 7, 11 y 14 mediante el uso de una cámara digital unida a un microscopio Nikon. La longitud de cada hueso metatarsiano se midió mediante el uso del software ImageJ y el aumento en la longitud ósea se expresó como un cambio porcentual a partir de la longitud medida en el día de la disección (media (SD)).

Resultados: Todos los compuestos de CNP aumentaron significativamente la longitud ósea en comparación con el grupo de control después de 11 días de tratamiento ($p < 0.05$; ANOVA bidireccional). Los aumentos totales en la longitud ósea fueron 28-48 % mayores después del tratamiento con los compuestos de CNP en comparación con el grupo de control después de 14 días en cultivo. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 27.

Tabla 27: Aumento en la longitud ósea después de la administración de los compuestos de CNP (100 nM):

Com-puesto	control		9384			9407			9435		
Día	media (%)	SD	media (%)	SD	p<	media (%)	SD	p<	media (%)	SD	p<
4	25.3	4.1	33.6	8.3	ns	35.1	4.1	ns	36.2	3.8	ns
7	32.9	4.9	42.6	7.0	0.05	45.4	4.5	0.001	47.3	2.5	0.001
11	36.8	3.1	50.1	7.2	0.01	53.2	6.4	0.001	53.9	4.8	0.001
14	40.1	3.7	54.4	7.9	0.01	55.8	8.2	0.01	59.2	3.5	0.001

Com-puesto	control		9480			9482			9483		
Día	media (%)	SD	media (%)	SD	p<	Me-dia (%)	SD	p<	Me-dia (%)	SD	p<
4	25.3	4.1	33.1	5.2	ns	37.7	10.9	ns	30.2	4.6	ns
7	32.9	4.9	43.9	4.9	0.01	47.1	10.3	0.05	39.5	8.8	ns
11	36.8	3.1	49.2	5.2	0.001	54.4	13.1	0.05	49.7	6.0	0.001
14	40.1	3.7	52.1	5.2	0.001	57.5	12.0	0.05	51.5	5.1	0.001

En la Tabla 27, los huesos metatarsianos se aislaron de ratones y se cultivaron durante hasta 14 días. La longitud se midió cada 3-4 días a lo largo del estudio y se expresó como cambio porcentual desde el día 0 (Media (SD)). Se indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (ANOVA bidireccional).

Conclusión: Este experimento demuestra que los compuestos de CNP de la presente invención son capaces de aumentar significativamente la longitud ósea en un modelo de ratón *ex vivo*.

Ejemplo 15: Estudio del crecimiento del ratón

El propósito de este estudio fue evaluar el crecimiento en ratones después del tratamiento con dos dosis de un compuesto de CNP.

Procedimiento: Los ratones (C57BL/6J, machos, edad 4 semanas; n=10) recibieron inyecciones subcutáneas diarias del compuesto 9482 o vehículo durante 35 días. Las formulaciones se prepararon de acuerdo con los principios descritos en Métodos generales de preparación - Método G (30 y 70 nmol/kg, 10 ml/kg; tampón de formulación fosfato de sodio 8 mM, glicerol 250 mM, polisorbato 20 al 0.007 %, pH 7.4). El peso corporal y la longitud de la cola y el cuerpo se midieron semanalmente a lo largo del estudio. El aumento en el crecimiento se expresó como cambio porcentual desde el día 0 (media (SD)).

Resultados: Tanto las dosis de 30 como de 70 nmol/kg del compuesto de CNP 9482 aumentaron significativamente la longitud de la cola y el cuerpo después de 7 y 18 días, respectivamente, (p<0.05, ANOVA bidireccional) en comparación con el control. Después de 35 días, el cambio en la longitud de la cola (desde el día 0) aumentó un 45 y un 83 %, respectivamente, después del tratamiento con 30 y 70 nmol/kg de compuesto de CNP en comparación con los animales de control. La longitud del cuerpo fue un 30 y un 67 % mayor, respectivamente, en comparación con el grupo de control después del tratamiento con 30 y 70 nmol/kg de compuesto de CNP durante 35 días. Los resultados del estudio se resumen en las Tablas 28 y 29.

Tabla 28: Longitud de la cola de ratones tratados con inyecciones diarias del compuesto de CNP durante 35 días

	Vehículo		9482 30 nmol/kg			9482 70 nmol/kg		
Día	Media (%)	SD	Media (%)	SD	p<	Media (%)	SD	p<
7	7.7	2.3	11.8	3.0	0.05	14.3	3.2	0.001
14	10.8	3.0	16.0	3.9	0.01	20.3	5.0	0.001
21	18.1	3.2	24.1	3.8	0.01	29.0	5.0	0.001
28	17.3	2.7	25.6	4.0	0.001	32.0	4.8	0.001
35	19.5	3.2	28.5	4.7	0.001	35.7	4.6	0.001

En la Tabla 28, el aumento en la longitud de la cola se expresa como cambio porcentual desde el día 0 (media (SD)). Se indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (ANOVA bidireccional).

Tabla 29: Longitud del cuerpo de ratones tratados con inyecciones diarias del compuesto de CNP durante 35 días

	Vehículo		9482 30 nmol/kg			9482 70 nmol/kg		
Día	Media (%)	SD	Media (%)	SD	p<	Media (%)	SD	p<
8	9.4	2.2	10.2	2.3	ns	12.8	2.4	0.01
18	14.1	2.9	17.5	2.0	0.05	21.5	4.0	0.001
25	16.5	3.4	22.5	3.4	0.01	29.0	4.5	0.001
35	21.1	3.3	27.4	3.2	0.001	35.3	4.6	0.001

En la Tabla 29, el aumento en la longitud del cuerpo se expresa como cambio porcentual desde el día 0 (media (SD)). Se indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control (ANOVA bidireccional).

Conclusión: Este experimento muestra que los compuestos de CNP de la presente invención aumentan la longitud de la cola y el cuerpo de los ratones en un grado significativo cuando se administran por vía subcutánea en una formulación farmacéuticamente relevante.