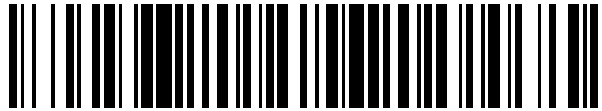


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 202**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/61** (2006.01)

**A61K 38/27** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2010 E 10701015 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2389389**

54 Título: **Compuestos de hormonas de crecimiento estables**

30 Prioridad:

**22.01.2009 EP 09151108**

**29.01.2009 US 148119 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.08.2015**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)**  
**Thurgauerstrasse 36/38**  
**8050 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**OLSEN, OLE HVILSTED;**  
**BREINHOLT, JENS;**  
**SCHIØDT, CHRISTINE BRUUN;**  
**DEMUTH, HELLE;**  
**NØRSKOV-LAURITSEN, LEIF y**  
**THYGESEN, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 542 202 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de hormonas de crecimiento estables

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a compuestos de hormonas de crecimiento (GH, del inglés "growth hormone") estables, resistentes a la degradación proteolítica.

**Antecedentes de la invención**

10 La hormona de crecimiento (GH) es una hormona polipeptídica secretada por la glándula pituitaria anterior en los mamíferos. Dependiendo de las especies, la GH es una proteína compuesta de aproximadamente 190 residuos de aminoácidos que se corresponden a un peso molecular de aproximadamente 22 kDa. GH se une a receptores de la superficie celular y lleva a cabo la señalización a través de los mismos, los receptores de GH (GHR). GH tiene un papel clave en la promoción del crecimiento, el mantenimiento de una composición corporal normal, el anabolismo y el metabolismo de lípidos. También tiene efectos directos sobre el metabolismo intermedio, tales como una disminución de la captación de glucosa, un aumento de la lipólisis, un aumento de la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas. La hormona también ejerce efectos sobre otros tejidos, incluyendo el tejido adiposo, hígado, intestino, riñón, esqueleto, tejido conectivo y muscular. La hGH recombinante ha sido producida y está comercializada como, por ejemplo: Genotropin® (Pharmacia Upjohn), Nutropin® y Protropin® (Genentech), Humatrope® (Eli Lilly), Serostim® (Serono), Norditropin (Novo Nordisk), Omnitrope (Sandoz), Nutropin Depot (Genentech y Alkermes). Además, un análogo con un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal también se comercializa como, por ejemplo: Somatonorm® (Pharmacia Upjohn/Pfizer).

20 La GH comparte una topología común con los otros miembros de la familia de proteínas de GH, prolactina (PRL) y lactógeno placentario (LP). La GH se clasifica como una proteína de un haz de cuatro hélices (Figura 1) que presenta una topología de "arriba-arriba-abajo-abajo", con dos enlaces disulfuro conservados. Específicamente, la GH humana de tipo silvestre (hGH) está compuesta de 191 residuos de aminoácidos y tiene cuatro residuos de cisteína en las posiciones 53, 165, 182 y 189, que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína mediante la formación de dos enlaces disulfuro intramoleculares que conectan C53 con C165 y C182 con C189, respectivamente (Figura 1). La estructura de la hGH se ha determinado experimentalmente por cristalografía de rayos X en la forma libre (Chantale L. et al., (1995) Protein and Peptide Letters 3, 333-340) y en forma de complejo con su proteína de unión (el dominio extracelular del GHR humano (hGHR)) (Devos, A. M. et al., (1992) Science 255, 306-312). Estas estructuras han sido depositadas en el Protein Data Bank (PDB) y están a disposición del público (códigos de acceso al PDB, 1 HGU y 1 HWG, respectivamente). Por lo tanto, a partir de las estructuras de hGH publicadas, se pueden identificar residuos importantes para la unión de hGH a hGHR. Además, las propiedades dinámicas de hGH han sido estudiadas por espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Kasimova M.R. et al. J. Mol. Biol. (2002) 318, 679-695). Combinando los datos de rayos X y de RMN se pueden distinguir regiones de hGH que están bien estructuradas y bien definidas, de regiones que están menos estructuradas y son menos dinámicas. Se espera que las regiones menos estructuradas y dinámicas de hGH sean particularmente susceptibles a una escisión proteolítica, y una estabilización adecuada de tales regiones conduciría a una mejor estabilidad proteolítica incrementada.

hGH ha sido objeto de numerosas mutagénesis en intentos de producir análogos de hGH con propiedades químicas o biológicas deseadas. Específicamente, se han descrito mutantes de cisteína para varios fines.

40 El documento US 2003/0162949 describe variantes de cisteína de miembros de la familia de supergenes de GH. Se proporciona un método general para la creación de conjugados biológicamente activos, específicos del sitio, de estas proteínas. El método implica la adición de residuos de cisteína a regiones no esenciales de las proteínas, o sustituir residuos de cisteína por aminoácidos no esenciales en las proteínas usando mutagénesis dirigida al sitio y luego acoplar covalentemente un polímero que reacciona con cisteína u otro tipo de resto reactivo con cisteína, a las proteínas a través del residuo de cisteína añadido

45 El documento WO 02/055532 describe mutantes de hGH modificados genéticamente que tienen al menos un resto no polipeptídico fijado covalentemente, en particular mutantes de hGH en donde un residuo de cisteína introducido se utilizó para la pegilación.

50 El documento US 5.951.972 describe proteínas y polipéptidos de mamífero y ser humano naturales y recombinantes derivatizados, fisiológicamente activos en los que al menos un residuo de cisteína de origen natural o incorporado dentro de la proteína, se derivatiza con diversos sustituyentes.

55 La escisión proteolítica de la hGH se ha estudiado en detalle. El bucle largo formado por los residuos 128 a 154 tiene sitios de escisión putativos para varias proteasas, tales como trombina, plasmina, colagenasa, subtilisina y proteasas de serina de tipo quimotripsina. Por consiguiente, esta parte de la hGH ha mostrado ser particularmente susceptible a la escisión proteolítica (Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. (1984) 46, 33-42). Las enzimas que se han descrito porque degradan la hGH, incluyen trombina, plasmina, subtilisina, proteinasas de serina de tipo quimotripsina y caliceínas.

La degradación de la hGH en el tejido de rata ha sido investigada (Garcia-Barros et al. J. Endocrinol. Invest. (2000) 23, 748-754).

5 Se encontró inicialmente que proteasas de la glándula tiroidea de rata de tipo quimotripsina, que favorecen la escisión en residuos de aminoácidos voluminosos y lipofílicos, escindían el enlace peptídico entre Y143 y S144, dando como resultado una molécula de dos cadenas, seguida de la escisión entre Y42 y S43, que liberaba el péptido N-terminal F1-Y42. El bucle de división en la molécula de dos cadenas se procesa adicionalmente mediante escisión entre F146 y D147 por proteasas de tipo quimotripsina y adicionalmente por la acción de carboxipeptidasas.

Se han descrito varios métodos para producir análogos de hGH estabilizados frente a la degradación proteolítica.

10 Alam et al., J. Biotech. 65, 183-190 (1998) diseñaron mutantes de hGH resistentes a la trombina y la plasmina mediante mutaciones puntuales específicas. La trombina escinde la hGH específicamente entre R134 y T135, y el mutante doble R134D, T135P produjo una variante de hGH resistente a la escisión con trombina, y el mutante triple R134D, T135P, K140A dio como resultado una resistencia a la plasmina. Además, el último mutante de hGH era resistente a la proteólisis con plasma humano durante un período de 7 días.

15 El documento EP534568 describe mutantes de hGH estabilizados frente a la degradación proteolítica mediante la mutación de R134 a alanina, leucina, treonina, fenilalanina, prolina o histidina.

El documento WO2004022593/Nautilus describe métodos generales de evolución dirigida, con rendimiento elevado para producir citocinas modificadas, incluyendo variantes de GH, con mayor estabilidad proteolítica.

20 El documento WO2006048777/Nautilus describe específicamente análogos de hGH modificados con mayor estabilidad proteolítica. Los análogos contienen de una a cinco mutaciones en las posiciones 1-55, 57, 58, 60-63, 67-87, 89-91, 93, 95-100, 102-128, 131-132, 135-139, 141, 142, 144, 148-182, 184, 185 y 187-191. La introducción de residuos de cisteína puede conducir potencialmente a la formación de dímeros enlazados con disulfuro no deseados y en el documento WO2006048777 la sustitución de residuos de aminoácidos con cisteína se excluye específicamente del alcance; en el documento WO2006048777 (pág. 65) se afirma: "La sustitución de aminoácidos con residuos de cisteína se evita explícitamente ya que este cambio podría conducir potencialmente a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares".

25 Existe una necesidad evidente de desarrollar compuestos de hGH que sean resistentes a la degradación proteolítica. Tales compuestos estabilizados deben mostrar una mayor estabilidad frente a la escisión proteolítica, a la vez que conservan las propiedades biológicas deseadas de hGH. Tales moléculas de GH tendrían una estabilidad incrementada, un aclaramiento más lento y/o una semivida *in vivo* prolongada.

30 Además los agentes terapéuticos de proteínas se tienen que administrar generalmente por vía intravenosa o subcutánea, ya que normalmente no están suficientemente disponibles por vía oral. La baja biodisponibilidad oral de las proteínas se debe en parte a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, también existe una necesidad de desarrollar compuestos de hGH que se puedan administrar por vía oral para tratar trastornos relacionados con hGH.

### 35 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de hGH que comprenden enlaces disulfuro adicionales. En los compuestos de hGH de la presente invención, se ha introducido al menos un residuo adicional de cisteína mediante la mutación de al menos un aminoácido a cisteína, en la secuencia de tipo silvestre de hGH. En los compuestos de hGH de la presente invención, los sitios de mutación se eligen de manera que (1) el(los) residuo(s) de cisteína introducido(s) se coloca(n) apropiadamente en la estructura tridimensional de la proteína plegada para permitir la formación de enlaces disulfuro adicionales, que no están presentes en la proteína de tipo silvestre (2) la estructura natural de la hGH no está interrumpida (3) el compuesto de hGH muestra mayor estabilidad frente a la escisión proteolítica, en comparación con la hGH de tipo silvestre u otras funcionalidades mejoradas y (4) el compuesto de hGH conserva las actividades biológicas deseadas asociadas con hGH de tipo silvestre. Tales variantes con disulfuro de compuestos de hGH resistentes a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal, se pueden desarrollar como fármacos administrados oralmente para el tratamiento de trastornos relacionados con la hGH.

### Breve descripción de los dibujos

#### Figura 1

50 Estructura de la hGH unida a dos copias de la proteína que se une a hGH (PDB 1 HWG). Las cuatro hélices principales de la hGH se muestran en color gris oscuro y se etiquetan con H1-H4. Las direcciones (N → C terminal) se indican mediante flechas. Los extremos N-terminal y C-terminal de la hGH se etiquetan con N y C, respectivamente. Los dos enlaces disulfuro que conectan C53 con C165 y C182 con C189, respectivamente, están representados por barras y bolas negras. También se marcan L128 y D154 que representan el primer y el último residuo, respectivamente, en el bucle flexible largo que conecta H3 y H4.

#### 55 Figura 2

Secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de hGH con las cuatro hélices principales (H1-H4) destacadas y marcadas. También se marcan los tres bucles (L1-L3) que conectan las hélices principales. Las definiciones de hélice se refieren a hGH formando un complejo con su proteína de unión (PDB 1 HWG).

### Figura 3

5 Evolución temporal de la digestión proteolítica de hGH de tipo silvestre y compuestos de hGH con enlaces disulfuro adicionales. Las proteasas utilizadas son quimotripsina (panel A) y elastasa (Panel B). El ensayo se realiza tal y como se describe en el Ejemplo 5. La cantidad de proteína intacta (en % con respecto a t = 0) se representa gráficamente frente al tiempo de incubación. Los T<sup>1/2</sup> (horas) obtenidos ajustando los datos a exponenciales individuales, se enumeran en las tablas.

### 10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de hGH estables que tienen enlaces disulfuro adicionales. Los enlaces disulfuro se forman entre parejas de cisteínas, de las cuales una o ambas son introducidas por mutaciones puntuales en la secuencia de hGH de tipo silvestre. Los sitios de mutación se seleccionan de manera que los residuos de cisteína introducidos se dispongan apropiadamente en la estructura tridimensional de la proteína plegada, para permitir la formación de un enlace disulfuro. Si solo se introduce una cisteína, su pareja para la formación de un enlace disulfuro incluirá uno de los cuatro residuos de cisteína presentes en hGH de tipo silvestre. La proteína plegada con el enlace disulfuro adicional se puede obtener mediante la expresión del mutante de hGH con una cisteína apropiada, en forma soluble, a través de un organismo hospedador adecuado, o recuperarla a partir de cuerpos de inclusión usando condiciones de replegamiento convencionales para compuestos de hormona, de crecimiento, que son bien conocidos por los expertos en la técnica (Cabrita y Bottomley, *Biotechnology Annual Review* 10, 31-50 (2004)). La identificación de las posiciones que son candidatas para la introducción de enlaces disulfuro adicionales, se puede auxiliar con métodos computacionales, por ejemplo, utilizando la estructura tridimensional de hGH determinada experimentalmente (PDB código de acceso 1 HWG) que forma un complejo con dos copias de su proteína de unión. La selección de posiciones adecuadas para la introducción de enlaces disulfuro se puede basar en criterios de distancia y geometría de los enlaces disulfuro descritos en Dombkowski A., A., *Bioinformatics* 19, 1852-1853 (2003) y Petersen et al., *Protein Eng.* 12, 535-548 (1999).

Los mutantes de cisteína se seleccionan de manera que los enlaces disulfuro introducidos no alteren la estructura natural de la proteína y tengan un impacto negativo mínimo sobre la actividad biológica deseada, asociada con hGH. Por lo tanto, los compuestos se construyen de tal manera que los enlaces disulfuro introducidos no afecten negativamente a la interacción con hGHR. Las regiones en hGH que son importantes para la interacción con el receptor han sido identificadas a partir de 1 HWG. Por lo tanto, la selección de posiciones adecuadas para la introducción de enlaces disulfuro, que sean neutras con respecto a la actividad biológica, puede estar guiada gracias al análisis de la estructura de 1 HWG.

Los mutantes de cisteína se pueden seleccionar de tal modo que los enlaces disulfuro introducidos proporcionen una mayor estabilidad frente a la escisión proteolítica. La susceptibilidad de una proteína frente a la escisión con una proteasa se define en parte por la secuencia primaria de aminoácidos de dicha proteína. Las proteasas pueden ser relativamente inespecíficas o pueden reconocer, con un grado variable de selectividad, motivos específicos en la secuencia primaria de los aminoácidos. Sin embargo, la estructura tridimensional y la dinámica de la molécula de proteína que actúa como un sustrato, influyen fuertemente sobre la estabilidad proteolítica. Estructuras de bucle extremadamente flexibles y dinámicas son particularmente vulnerables a la escisión catalizada con proteasas, mientras que las regiones bien estructuradas son generalmente menos vulnerables. Por lo tanto, una protección contra la escisión proteolítica se puede conseguir mediante la estabilización de regiones dinámicas de una proteína, introduciendo enlaces disulfuro.

Un aspecto de la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende enlaces disulfuro adicionales en SEQ ID No. 1. Tal y como se describe en esta memoria a continuación, el polipéptido de un compuesto de hormona de crecimiento de acuerdo con la invención tiene preferiblemente un nivel elevado de identidad con la hormona de crecimiento humana, identificada por SEQ ID No. 1 y, en consecuencia, un compuesto de hormona de crecimiento comprende uno o varios enlaces disulfuro adicionales en comparación con la hormona de crecimiento humana, tal y como se define en SEQ ID No. 1.

50 Por consiguiente, una realización de la presente invención proporciona compuestos de GH estables de acuerdo con SEQ ID No.1 que se han hecho resistentes a la degradación proteolítica mediante la introducción de enlaces disulfuro adicionales.

En una realización de acuerdo con la invención, un compuesto de hormona de crecimiento comprende enlaces disulfuro adicionales entre al menos una de las parejas de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.

- 5 En una realización de la presente invención un compuesto de hormona de crecimiento comprende enlaces disulfuro adicionales entre al menos una de las parejas de aminoácidos en las posiciones correspondientes, pero no limitadas a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.
- 10 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento comprende enlaces disulfuro adicionales entre al menos una de las parejas de aminoácidos en las posiciones correspondientes, pero no limitadas a A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C y R94C/D107C en SEQ ID No. 1.
- 15 En una realización de acuerdo con la invención, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.
- 20 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones que se corresponden, pero no están limitadas a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.
- 25 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones que se corresponden, pero no están limitadas a A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C y R94C/D107C en SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento de la presente invención comprende una pareja de mutaciones correspondiente a la posición Q84C/Y143C en SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización de la presente invención, la estabilidad proteolítica de un compuesto de hormona de crecimiento se logra mediante la introducción de un enlace disulfuro entre un segmento de bucle y una estructura helicoidal.
- En una realización de la presente invención, la estabilidad proteolítica de un compuesto de hormona de crecimiento se logra mediante la introducción de un enlace disulfuro dentro de un segmento de bucle.
- 35 En una realización de la presente invención, la estabilidad proteolítica de un compuesto de hormona de crecimiento se logra mediante la introducción de un enlace disulfuro entre segmentos de bucle.
- 40 En una realización de la presente invención, la estabilidad proteolítica de un compuesto de hormona de crecimiento se logra mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las hélices.
- 40 En una realización de la presente invención, al menos uno de los enlaces disulfuro introducidos enlaza dos residuos de cisteína de un compuesto de hormona de crecimiento, en donde al menos uno de dichos residuos de cisteína no está presente en hGH de tipo silvestre.
- 45 En una realización de la presente invención, los enlaces disulfuro introducidos de un compuesto de hormona de crecimiento están posicionados entre residuos de cisteína que se seleccionan usando criterios de distancia y de geometría, descritos en Dombkowski A., A., *Bioinformatics* 19, 1852-1853 (2003) y Petersen et al., *Protein Eng.* 12(7) 535-548 (1999).
- 45 En una realización de la presente invención, el o los enlaces disulfuro introducidos del compuesto de hormona de crecimiento estabilizan el bucle que conecta H3 y H4 (L3, residuos 128-154), es decir, al menos una de las cisteínas en el enlace disulfuro introducido está posicionada en el segmento que comprende los residuos 128-154 (Figura 1 y 2).

Tabla 1

	<b>Primer aminoácido tal como se define por la alineación de secuencias con SEQ ID No. 1.</b>	<b>Segundo aminoácido tal como se define por la alineación de secuencias con SEQ ID No. 1.</b>	<b>Segmentos de la estructura secundaria conectados<sup>a</sup></b>
--	---	--	---

ES 2 542 202 T3

	<b>Primer aminoácido tal como se define por la alineación de secuencias con SEQ ID No. 1.</b>	<b>Segundo aminoácido tal como se define por la alineación de secuencias con SEQ ID No. 1.</b>	<b>Segmentos de la estructura secundaria conectados<sup>a</sup></b>
1.	16	117	H1-H3
2.	17	174	H1-H4
3.	21	170	H1-H4
4.	26	102	H1-L2
5.	26	103	H1-L2
6.	47	50	L1-L1
7.	49	161	L1-L1
8.	54	143	L1-L3
9.	54	144	L1-L3
10.	54	146	L1-L3
11.	55	143	L1-L3
12.	57	143	L1-L3
13.	58	141	L1-L3
14.	58	143	L1-L3
15.	58	144	L1-L3
16.	59	137	L1-L3
17.	61	66	L1-L1
18.	61	67	L1-L1
19.	71	132	L1-L3
20.	73	132	H2-L3
21.	73	139	H2-L3
22.	77	138	H2-L3
23.	77	139	H2-L3
24.	81	141	H2-L3
25.	81	143	H2-L3
26.	84	143	H2-L3
27.	84	144	H2-L3
28.	85	143	H2-L3
29.	85	144	H2-L3
30.	89	146	H2-L3
31.	92	146	H2-L3
32.	92	148	H2-L3
33.	94	107	H2-H3
34.	102	105	L2-H3
35.	156	146	H4-L3
36.	156	148	H4-L3
37.	185	188	Ct-Ct

a) H1-H4 se refiere a la hélice 1-4, L1-L3 se refiere a los bucles 1-3 y Ct se refiere a un segmento C-terminal.

- 5 Como se ha descrito anteriormente, la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional entre un segmento de bucle y un segmento de hélice o dentro de un segmento de bucle o entre segmentos de bucle o entre segmentos de hélice del polipéptido. La ubicación de cualquiera de estos enlaces disulfuro adicionales se describe con el fin de esta solicitud, haciendo referencia al polipéptido de hGH, tal y como se define en SEQ ID No. 1.
- 10 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento de acuerdo con la invención comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.
- 15 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.
- 20 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.
- 25 Una realización de acuerdo con la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional en el que al menos una de las cisteínas está presente en L3 (AA 128-154 en SEQ ID NO 1), o tal como en la región media del bucle definido por los AA 135-148 o los residuos de aminoácidos correspondientes.
- En una realización, en un compuesto de hormona de crecimiento al menos una de las cisteínas del enlace disulfuro adicional está presente en L3, en una posición correspondiente a AA 141, AA142, AA143, AA144, AA145 o AA146, preferiblemente, AA143 o AA144 en SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.
- 35 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.
- 40 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.
- Una realización de acuerdo con la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con L1.
- En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta un residuo de aminoácido correspondiente a AA54, AA56, AA57, AA58 o AA59 en L3 con un aminoácido correspondiente a AA143 o AA144 en L1 de SEQ ID No. 1.
- 45 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento según la invención comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C y/o S71C/S132C en SEQ ID No. 1.
- En una realización, una hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C y/o S71C/S132C en SEQ ID No. 1.
- 50 Una realización de acuerdo con la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con un segmento helicoidal, tal como la hélice 2 (H2).
- En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta un residuo de aminoácidos correspondiente a AA84 o AA85 en H2 con un aminoácido correspondiente a AA143 o AA144 en L3 de SEQ ID No. 1.
- En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones co-

responder a L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C y F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

- 5 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

Una realización de acuerdo con la invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L2 con la hélice 1.

- 10 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a D26C/V102C o D26C/Y103C.

Para los puentes disulfuro entre dos residuos de cisteína, los residuos de cisteína se pueden introducir o sustituir en cualquiera de las regiones o posiciones tal y como se han definido anteriormente, con el fin de facilitar la formación de uno o varios enlaces disulfuro introducidos según sea necesario. La sustitución y las inserciones de residuos de aminoácidos se pueden llevar a cabo mediante métodos convencionales conocidos por una persona experta en la técnica.

- 15 De acuerdo con la invención, el enlace o enlaces disulfuro adicionales se obtienen mediante la sustitución de aminoácidos en al menos dos aminoácidos, en comparación con SEQ ID No. 1. En una realización adicional, el compuesto comprende exactamente un enlace disulfuro adicional en comparación con SEQ ID No. 1. En una realización, el compuesto de acuerdo con la invención comprende al menos 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID No. 1. En una realización adicional, el compuesto comprende exactamente 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID No. 1. En una realización, el polipéptido de un compuesto de hormona de crecimiento de acuerdo con la invención comprende al menos dos cisteínas adicionales en comparación con la hormona de crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1. En una realización adicional, el polipéptido comprende exactamente dos cisteínas adicionales en comparación con la hormona de crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1.

- 20 En una realización de la presente invención, el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente a través de la fijación de restos tales como, pero no limitados a, PEGs, carbohidratos, aglutinantes de albúmina, ácidos grasos, cadenas de alquilo, grupos lipófilos, vitaminas, ácidos biliares o espaciadores, a las cadenas laterales o a la cadena principal del compuesto de hormona de crecimiento, además de los enlaces disulfuro adicionales que comprende.

En una realización de la presente invención, el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente con el fin de facilitar el transporte a través de los epitelios, cuando se compara con hGH.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento de la presente invención se modifica químicamente con el fin de obtener una duración prolongada de la acción *in vivo*.

- 35 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente con el fin de obtener una duración prolongada de la semivida funcional *in vivo*.

En una realización de la presente invención, las modificaciones químicas del compuesto de hormona de crecimiento también pueden ser de naturaleza transitoria, es decir, que se pueden eliminar fácilmente *in vivo*.

- 40 En una realización de la presente invención, las modificaciones del compuesto de hormona de crecimiento pueden tener lugar en cualquier residuo de aminoácido que no interfiere en la unión del compuesto de hormona de crecimiento con el hGHR.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una estabilidad incrementada frente a una escisión proteolítica.

- 45 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una estabilidad incrementada frente a una degradación proteolítica a través de una proteasa pancreática.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una estabilidad incrementada frente a una degradación proteolítica a través de proteasas presentes en el tracto gastrointestinal.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una estabilidad incrementada frente a una degradación proteolítica a través de proteasas presentes en el plasma de un mamífero.

- 50 Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende uno o varios enlaces disulfuro adicionales que están estabilizados frente a la degradación por proteasa(s), tales como proteasas digestivas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y/o elastasa.



En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una estabilidad incrementada frente a una degradación proteolítica con tripsina, quimotripsina y/o elastasa.

En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento está estabilizado frente a una degradación con quimotripsina y/o elastasa.

5 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en SEQ ID No. 1.

10 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a H21/M170, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C y/o S85C/Y143C en SEQ ID No. 1.

En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones que se corresponden con D26/V102C, D26/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

15 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en SEQ ID No. 1.

20 En una realización, un compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a Q84C/Y143C y/o S85C/Y143C en SEQ ID No. 1.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una semivida *in vivo* incrementada.

25 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento tiene una vida útil incrementada.

En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento puede ser una proteína de fusión.

30 Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento, en el que la secuencia de polipéptido es al menos 80%, tal como 90% o tal como 95% idéntica a hGH definida por SEQ ID No. 1. En otras realizaciones el polipéptido es 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a hGH definida por SEQ ID No. 1.

35 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 20%, tal como al menos 30%, por ejemplo al menos 40%, tal como al menos 50%, por ejemplo al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, tal como al menos 90% de identidad, por ejemplo al menos 95%, tal como al menos 96%, por ejemplo al menos 97%, tal como al menos 98%, por ejemplo al menos 99% de identidad con SEQ ID No. 1 y cuyo polipéptido tiene una actividad en el ensayo descrito en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 3A (ratas hipofisectomizadas) de al menos 1%, tal como al menos 5%, por ejemplo al menos 10%, tal como al menos 25% de la actividad de hGH. Para evitar dudas, un compuesto de hormona de crecimiento de la invención también puede tener una actividad mayor que hGH en estos ensayos. Si el compuesto de hormona de crecimiento está derivatizado de alguna manera, la actividad de la hormona de crecimiento en relación con hGH se debe medir en el compuesto de hormona de crecimiento no derivatizado, ya que la derivatización puede cambiar la actividad de manera significativa. Por ejemplo, en el caso de un compuesto de hormona de crecimiento derivatizado con un grupo modificador de propiedades que prolonga la semivida funcional *in vivo* del compuesto de hormona de crecimiento, la actividad del compuesto de hormona de crecimiento derivatizado puede ser mucho menor que la actividad de hGH, cuya disminución se contrarresta con un tiempo de residencia prolongado. En una realización, el compuesto de hormona de crecimiento es un fragmento de un polipéptido de este tipo, cuyo fragmento ha conservado una cantidad significativa de la actividad de hormona de crecimiento tal y como se ha descrito anteriormente.

45 En una realización de la presente invención, un compuesto de hormona de crecimiento es una versión truncada de hGH, es decir, uno o varios residuos de aminoácidos han sido eliminados de los extremos N-terminal y/o C-terminal que se corresponden a SEQ No. 1, en donde dicho compuesto conserva las propiedades biológicas deseadas de hGH de tipo silvestre.

50 Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento que comprende enlaces disulfuro adicionales en SEQ ID No. 1 o que comprende uno o varios enlaces disulfuro adicionales, en comparación con la hormona de crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1, en donde dicho compuesto

tiene una actividad *in vitro* que es comparable a la actividad *in vitro* de hGH definida por SEQ ID No. 1. La actividad *in vitro* de compuestos de hormona de crecimiento se mide preferiblemente en un ensayo BAF tal y como se describe en el Ejemplo 3 en el presente documento. En una realización, un compuesto de acuerdo con la invención puede tener una actividad *in vitro* que es diferente de la actividad *in vitro* de hGH. Como se ha descrito anteriormente, una menor actividad *in vitro* se puede compensar con otras funcionalidades *in vivo*. En una realización, la actividad *in vitro* puede ser tal como al menos 1%, tal como al menos 5%, por ejemplo al menos 10%, tal como al menos 25% de la actividad de hGH. En una realización adicional, la relación CE50 de un compuesto en relación con hGH de tipo silvestre definida por SEQ ID No. 1, no es más de 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, no más de 2. En una realización, la relación CE50 de dicho compuesto en comparación con hGH de tipo silvestre definida por SEQ ID No. 1, es de 5-0,01 o tal como de 3-0,01 o tal como de 2-0,01. En una alternativa, la CE50 se puede medir según la invención mediante un análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore) tal y como se describe en el Ejemplo 4. En realizaciones correspondientes, la actividad *in vitro* determinada mediante Biacore, puede ser tal como al menos 1%, tal como al menos 5%, por ejemplo al menos 10%, tal como al menos 25% de la actividad de hGH. En otras realizaciones, la relación CE50 de un compuesto en relación con hGH de tipo silvestre definida por SEQ ID No. 1, determinada por Biacore no es más de 10, no más de 8, no más de 6, no más de 4, no más de 2. En una realización, la relación CE50 de dicho compuesto en comparación con hGH de tipo silvestre definida por SEQ ID No. 1, es de 5-0,01 o tal como de 3-0,01 o como de 2-0,01.

Otros ejemplos de compuestos de GH en los que se pueden introducir puentes disulfuro adicionales incluyen los descritos en los documentos WO 92/09690 (Genentech), US 6.004.931 (Genentech), US 6.143.523 (Genentech), US 6.136.536 (Genentech), US 6.057.292 (Genentech), US 5.849.535 (Genentech), WO 97/11178 (Genentech), WO 90/04788 (Genentech), WO 02/055532 (Maxygen APS y Maxygen Holdings), US 5.951.972 (American Cyanamid Corporation), US 2003/0162949 (Bolder Biotechnologies, Inc.). Además se incluyen variantes naturales de hGH, tales como las de 20 kDa descritas por Masuda, N et al., Biochim. Biophys. Acta 949 (1), 125-131 (1988).

En todas las realizaciones descritas en este documento, una opción adicional es que el compuesto de hormona de crecimiento tenga un residuo Gly en una posición correspondiente a la posición 120 de SEQ ID No. 1.

En el presente contexto, las expresiones "hormona de crecimiento humana (hGH)", "hGH wt" y "hGH de tipo silvestre (wthGH)" se utilizan indistintamente y se refieren tanto a una proteína con una secuencia de aminoácidos como a SEQ ID No.1.

En el presente contexto, los términos "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente e indican lo mismo. Los términos "péptido" o "polipéptido" indican una secuencia de dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde dichos aminoácidos pueden ser naturales o no naturales. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no están codificados por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no están codificados por el código genético son, por ejemplo, Hyp (hidroxiprolina),  $\gamma$ -carboxiglutamato, Orn (ornitina), fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden aminoácidos producidos por síntesis química, tales como isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético, tales como D-alanina y D-leucina, Aad (ácido  $\alpha$ -aminoadípico), Aib (ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico), Abu (ácido  $\alpha$ -aminobutírico), Agl ( $\alpha$ -amino-glicina), Asu (ácido  $\alpha$ -aminosubérico), Cha ( $\beta$ -ciclopentil-alanina), Chg (ciclohexil glicina), Dab (ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico), Dap (ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropanoico), Hcy (homocisteína), Hpr (homoprolina), Nle (Norleucina), Phg (fenilglicina), Hph (homofenilalanina), 1Nal ( $\beta$ -1-naftil-alanina), 2Nal ( $\beta$ -2-naftil-alanina), 2Pal ( $\beta$ -2-piridil)alanina, 3Pal ( $\beta$ -3-piridil)alanina, Pip (ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico), Pra (propargil-glicina), Pyr (ácido piroglutámico), Gia (ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico), Hci (homocitrulina), Nva (norvalina), Tie (*terc*-butilglicina),  $\beta$ -alanina, ácido 3-aminometil benzoico y ácido antranílico.

El término también abarca el término "proteínas", que puede consistir en una cadena polipeptídica, o en dos o más cadenas polipeptídicas sostenidas entre sí mediante interacciones no covalentes o covalentes, tales como por ejemplo, puentes de cisteína.

Se debe entender que el término también está destinado a incluir péptidos, que se han derivatizado, por ejemplo, fijando restos tales como, pero no limitados a PEG, carbohidratos, ácidos grasos, aglutinantes de albúmina, cadenas de alquilo, grupos lipófilos, vitaminas, ácidos biliares o espaciadores, a las cadenas laterales o a la cadena principal del péptido que comprende además los enlaces disulfuro adicionales. El término péptido incluye cualquier péptido adecuado y se puede utilizar como sinónimo de los términos polipéptido y proteína, salvo que se indique de otro modo o se contradiga por el contexto, siempre que el lector reconozca que cada tipo de molécula respectiva que contiene polímeros de aminoácidos puede estar asociada con diferencias significativas y formar de ese modo realizaciones individuales de la presente invención (por ejemplo, un péptido tal como un anticuerpo, que se compone de múltiples cadenas polipeptídicas, es significativamente diferente, por ejemplo, de un anticuerpo de una sola cadena, una inmunoadhesina peptídica o un péptido inmunogénico de una sola cadena). Por lo tanto, el término péptido en el presente documento debe entenderse en general como referido a cualquier péptido adecuado de cualquier tamaño y composición adecuada (con respecto al número de aminoácidos y al número de cadenas asociadas en una molécula de proteína). Por otra parte, los péptidos descritos en este documento pueden comprender residuos de aminoácidos no naturales y/o no L, salvo que se indique de otro modo o se contradiga por el contexto.

El término péptido, a menos que se indique de otro modo o se contradiga por el contexto, (y si se describe como realizaciones individuales del(de los) término(s) polipéptido y/o proteína) también incluye moléculas de péptidos derivatizados. Una molécula peptídica derivatizada es una en la que uno o varios de los residuos de aminoácidos del péptido se han modificado químicamente (por ejemplo, por alquilación, acilación, formación de ésteres o formación de amidas) o se ha asociado con uno o varios sustituyentes atómicos o moleculares no aminoácidos y/o inorgánicos (por ejemplo, un grupo de polietilenglicol (PEG), un sustituyente lipofílico (que opcionalmente puede estar ligado a la secuencia de aminoácidos del péptido a través de un residuo o un grupo espaciador tal como  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ácido L/D-glutámico, ácido succínico y similares), un fluoróforo, una biotina, un radionúclido, etc.) y puede comprender también o alternativamente residuos de aminoácidos no esenciales, de origen no natural y/o no L, salvo que se indique de otro modo o se contradiga por el contexto (sin embargo, se debe reconocer una vez más que los derivados de este tipo se pueden considerar, por sí mismos, características independientes de la presente invención y la inclusión de este tipo de moléculas en el sentido de un péptido se realiza por razones de conveniencia para describir la presente invención, en lugar de dar a entender cualquier clase de equivalencia entre los péptidos desnudos y tales derivados).

Ejemplos no limitantes de tales residuos de ambos aminoácidos incluyen, por ejemplo, ácido 2-amino-adípico, ácido 3-aminoadípico,  $\beta$ -alanina, ácido  $\beta$ -aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alohroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilglicina, N-metilsoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, propargil-glicina y aminoácidos halogenados de estatina.

Un "compuesto" descrito en la presente invención puede ser una "proteína" o un "péptido" o un "polipéptido" que puede ser un "análogo" o un "derivado" o una "variante", que conserva las actividades biológicas deseadas, similares a wthGH, independientemente de la forma en que se ha modificado.

El término "análogo" o "variante" tal y como se usa en el presente documento, cuando se hace referencia a un polipéptido, significa una versión modificada de dicho péptido en donde uno o varios residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o varios residuos de aminoácidos se han delecionado del péptido y/o en donde uno o varios residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Una sustitución o adición o delección de residuos de aminoácidos de este tipo puede tener lugar en el extremo N-terminal del péptido y/o en el extremo C-terminal del péptido y/o entre el extremo N-terminal o C-terminal del péptido. En todos los aminoácidos en los que no se indica el isómero óptico, se ha de entender que significa el L-isómero.

Las expresiones "enlace disulfuro" o "puente disulfuro" se utilizan indistintamente y están destinadas a indicar lo mismo. Un "enlace disulfuro" o un "puente disulfuro" en las proteínas se forma entre los grupos tiol de los residuos de cisteína.

Las expresiones "cisteína adicional" o "cisteína introducida" se utilizan indistintamente y están destinadas a indicar lo mismo. Las expresiones están destinadas a incluir un residuo de cisteína que no está presente en hGH de tipo silvestre. Para minimizar los cambios estructurales, el(los) residuo(s) de cisteína se introduce(n) por lo general mediante sustitución de residuo(s) de aminoácidos, con lo que se conserva la longitud de hGH. La inserción de un residuo cys adicional se puede tolerar en secciones de bucle o en los bordes de las hélices, mientras que la introducción de residuos cys dentro de las hélices es menos adecuada.

Las expresiones "enlace disulfuro adicional" o "enlace disulfuro introducido" se utilizan indistintamente y están destinadas a indicar lo mismo. Las expresiones están destinadas a incluir enlaces disulfuro formados entre dos residuos de cisteína de los cuales al menos uno no está presente en hGH de tipo silvestre.

El término "derivado", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a un péptido o un polipéptido, en el que uno o varios residuos de aminoácidos del péptido han sido modificados químicamente mediante la introducción de un polímero tal como PEG, restos de carbohidratos, aglutinantes de albúmina, ácidos grasos, grupos lipófilos, vitaminas, ácidos biliares o espaciadores en las cadenas laterales o la cadena principal del compuesto de hormona de crecimiento. Las modificaciones químicas pueden ser también de naturaleza transitoria, es decir, que se pueden eliminar fácilmente *in vivo*. Las modificaciones químicas se pueden introducir después de la traducción, por ejemplo, por la propia célula o mediante modificaciones químicas realizadas en el péptido después de la expresión.

El término "identidad" tal y como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, tal y como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de las secuencias entre los péptidos, tal y como se determina por el número de coincidencias entre hebras de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si los hay) tratadas con un modelo matemático determinado o un programa informático (es decir, "algoritmos"). La identidad de péptidos relacionados se puede calcular fácilmente por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., compilador, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., compilador, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data,

Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., compiladores, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., compiladores, M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

5 Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Métodos para determinar la identidad se describen en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md 20894; Altschul et al., supra). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido, también se puede usar para determinar la identidad.

15 Por ejemplo, utilizando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), dos péptidos para los que se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia están alineados para que tengan una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "intervalo emparejado", tal como lo determina el algoritmo). Una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está empleando; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada emparejamiento perfecto de aminoácidos por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es normalmente {fracción (1/10)} veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62, se utilizan junto con el algoritmo. Una matriz de comparación estándar (véase, Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., PNAS USA 89, 10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) también es utilizada por el algoritmo.

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias de péptidos incluyen los siguientes:

25 Algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., PNAS USA 89, 10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12, Penalización por longitud de hueco: 4, Umbral de similitud:

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con una falta de penalización para los huecos en los extremos) utilizando el algoritmo GAP.

30 El término "proteasa o proteasas" está destinado a incluir todas las enzimas que poseen la capacidad de catalizar una escisión hidrolítica de un enlace peptídico. Las proteasas pueden ser proteasas, proteinasas o peptidasas intracelulares, extracelulares o unidas a la membrana, e incluyen proteasas en el lumen del intestino de mamíferos y proteasas presentes en el plasma de mamíferos. Las proteasas pueden ser de ambos tipos de proteasas, endoproteasas y exoproteasas. Las proteasas pueden ser, pero no se limitan a, de los siguientes tipos: serina, cisteína, aspártico o metaloproteasas. Ejemplos específicos de proteasas son tripsina, quimotripsina, pepsina, elastasa, factor VIIa, factor Xa, proteinasa K, carboxipeptidasa, DPPIV, endopeptidasa neutra, granzima B, prolina-endopeptidasa, peptidasa estafilocócica I, termolisina, trombina, proteinasa Arg-C, endopeptidasa Asp-N, caspasa 1-10, clostripaína, enterocinasa, glutamil endopeptidasa, granzima B, LysC, LysN, prolina-endopeptidasa y peptidasa estafilocócica I.

40 Las expresiones "resistente a la degradación proteolítica" o "mayor estabilidad frente a la degradación proteolítica" o "mayor estabilidad frente a una escisión proteolítica" o "mejora de la estabilidad proteolítica" o "estabilidad proteolítica" se usan indistintamente y están destinadas a indicar lo mismo. Usadas en relación con un compuesto de hGH de la invención, las expresiones están destinadas a indicar que la cadena polipeptídica de dicho compuesto de hGH se escinde con una tasa más lenta, en comparación con hGH de tipo silvestre, con una proteasa en condiciones específicas.

45 La tasa de escisión proteolítica de una proteína se puede medir a través de varias técnicas conocidas por una persona experta en el campo. Un ejemplo de un ensayo de medición de la tasa de degradación de hGH o un compuesto de hGH se describe en el Ejemplo 5.

50 La invención también se refiere a métodos útiles para mejorar las propiedades farmacológicas de compuestos de hGH. Estas propiedades farmacológicas podrían ser, por ejemplo, un aumento de la semivida funcional *in vivo*, la semivida plasmática *in vivo*, el tiempo medio de residencia, una disminución del aclaramiento renal.

55 La expresión "semivida funcional *in vivo*" se utiliza con su significado normal, es decir, el tiempo durante el cual el 50% de la actividad biológica del péptido, por ejemplo, un compuesto de hormona de crecimiento, en donde el compuesto de hormona de crecimiento todavía está presente en el cuerpo/órgano diana, o el tiempo durante el cual la actividad del péptido, por ejemplo, un compuesto de hormona de crecimiento, es el 50% de su valor inicial. Como alternativa a la determinación de la semivida funcional *in vivo*, se pueden determinar "la semivida plasmática *in vivo*" y una acción prolongada, es decir, el tiempo durante el cual circula el 50% del péptido en el torrente sanguíneo antes de ser aclarado. La determinación de la semivida plasmática es frecuentemente más simple que la determinación de la semivida funcional y la magnitud de la semivida plasmática es generalmente una buena indicación de la magnitud

de la semivida funcional *in vivo*.

La presente invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de hormona de crecimiento tal y como se definen y describen en este documento.

5 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, bálsamos, pastas, emplastos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, comprimidos con coformulación de compuestos potenciadores de la absorción, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, cápsulas recubiertas, supositorios, gotas, geles, espray, polvos, micropartículas, nanopartículas, aerosoles, inhaladores, solución de inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, 10 gelificante *in situ*, configuración *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución para infusión e implantes.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a través una administración oral, subcutánea, intramuscular, nasal e i.v.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas orales se pueden administrar a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, en el estómago y el intestino.

15 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles en la composición de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar de un conjugado peptídico, tal como por ejemplo, un conjugado de GH, usando, por ejemplo un inhalador de dosis medida, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos los dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 En una realización, la composición farmacéutica de la invención puede estar preparada adicionalmente, o fijada, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, un vehículo farmacéutico, un sistema de administración de fármacos y un sistema avanzado de administración de fármacos con el fin de mejorar aún más la estabilidad del conjugado de GH, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos 25 adversos, conseguir una cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica y aumentar el cumplimiento del tratamiento indicado por el paciente o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de vehículos, sistemas de administración de fármacos y sistemas avanzados de administración de fármacos incluyen, pero no se limitan a, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), acrilato y polímeros de metacrilato, poli(ácido láctico y ácido glicólico) y copolímeros de bloque 30 de los mismos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos por los expertos en la técnica de comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de las mismas, y dendrímeros.

35 Los diversos ejemplos de sistemas de administración de una formulación oral, incluyen tensioactivos no iónicos, que son conocidos por aumentar la penetración de compuestos hidrófilos. Ejemplos de tensioactivos no iónicos son; caprato de sodio, ácido tartárico, Brij56, Brij58, Brij35, Brij30, azúcares de ácidos grasos, taurodesoxicolato de sodio, dodecil sulfato sódico, *p-t*-octil fenol poloxietileno-9.5 (Triton X-100) como se describe por Takatsuka et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 52-58 (2006). El sistema de administración oral también puede incluir inhibidores de proteasas y sustancias mucolíticas. Ejemplos de inhibidores de proteasas son inhibidores de tripsina de soja, aprotinina y quimostatina. Ejemplos de sustancias mucolíticas son ditiotreitil y *N*-acetil-cisteína. Mejora de la absorción intestinal de 40 compuestos hidrófilos que se absorben poco mediante el uso simultáneo de un agente micolítico y un tensioactivo no iónico. También el 5-CNAC y compuestos similares desarrollados por Emisphere (documentos WO2008101240, WO200811283687, WO2008027854, WO2008014430, US20080095837).

45 Los sistemas de administración de formulaciones orales también pueden incluir proporcionar moduladores claudina, que tienen la función de abrir las uniones estrechas específicas de las células del epitelio. Estos moduladores claudina actúan tanto de forma transitoria como no transitoria e interfieren con los complejos de proteínas que sostienen las células del epitelio firmemente unidas con las uniones estrechas (Kondoh et al., Mol Pharmacology 67, 749-756 (2005)). Otros ejemplos de un sistema de administración para una formulación oral incluyen agentes mucoadhesivos, por ejemplo, aditivos que contienen tiol (coformulación) o cadenas laterales unidas covalentemente pueden 50 aumentar la adhesión a la capa mucosa, moléculas de quitosano y carbómero, poli(acrilatos), PEG y sus derivados, (Palmerberger et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 66, 405-412 (2007); Leitner, V.M et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 207-214 (2003); H.L. Leußen et al., Parm. Res. 13, 1668-1672 (1996); H.L. Leußen et al., Int. J. Pharmaceuticals 141, 39-52 (1996); Takatsuka et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 52-58 (2006)). Otros ejemplos de sistemas de administración para una formulación oral incluyen acumulaciones cavelolares/lipídicas, SMTV (transportador de multivitaminas dependiente de sodio). Otros ejemplos de formulaciones para la administración oral incluyen la transición mediada por receptor tal como IRF (receptor de factor intrínseco) usando vitamina B12 (cobalamina) como sustrato, FcRn (receptor Fc neonatal) y transferrina. (M. Gumbleton, Adv. Drug. Del. Rev. 49, 281-300 (2001); K.C. Partlow et al., Biomaterials 29, 3367-3375 (2008); (Lee et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 46, 211-217 (2007); S.Y. Chae et al., Bioconjugate Chem. 19, 334-341 (2008); Russell-Jones G.: capítulo 17 en Membrane Transporters as

Drug Targets (1999); Said y Mohammed Curr. Opin. Gastroent. 22, 140-146 (2006); Chalasani et al., J. Con. Release 117, 421-429 (2007); H. Li & Z.M. Qian Med. Res. Rev. 22, 225-250 (2002); Liang & Yang Biochem. Biophys. Res. Comm. 225, 734-738 (2005).

5 En una realización, los compuestos de GH de la presente invención ejercen una actividad de hormona de crecimiento y se pueden usar para tratar enfermedades o estados que se beneficiarán de un aumento de la cantidad de hormona de crecimiento circulante. Tales enfermedades o estados incluyen una carencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (SPW); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/HALS); niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); poca estatura en niños con muy bajo peso al nacer (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; poca estatura idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en huesos largos o de los mismos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso y dedos; fracturas en huesos esponjosos o de los mismos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base de los pies; pacientes después de una cirugía del tendón o del ligamento, por ejemplo, de la mano, la rodilla o el hombro; pacientes que tienen o que están experimentando una osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o de disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material osteosintético, tal como clavos, tornillos y placas; pacientes con falta de unión o mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de la tibia o el primer dedo del pie; pacientes después del implante de un injerto; degeneración del cartílago articular en la rodilla causado por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos con diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a una malnutrición en APCD; inversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; VIH en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Chron; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/drogas o trauma neurológico; envejecimiento; ancianos débiles; osteoartritis; cartílago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; o baja estatura debido a un tratamiento con glucocorticoides en niños. Las hormonas de crecimiento también se han utilizado para acelerar la curación del tejido muscular, el tejido nervioso o las heridas; la aceleración o la mejora del flujo sanguíneo al tejido dañado; o la disminución de la tasa de infección en el tejido dañado.

Una descripción se refiere a un método para tratar enfermedades, en donde la actividad del compuesto de hormona de crecimiento se puede utilizar para tratar enfermedades o estados que se beneficiarán de un aumento de la cantidad de compuesto de hormona de crecimiento circulante, comprendiendo dicho método administrar a un paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de compuesto de hormona de crecimiento o su conjugado de SEQ ID No.1.

Una descripción se refiere a un método que comprende la administración a un paciente que lo requiera de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de hormona de crecimiento de acuerdo con la invención. La presente descripción proporciona un método para el tratamiento de estas enfermedades o estados, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo requiera una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de hormona de crecimiento de acuerdo con la presente invención.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención, tal y como se emplea en esta memoria significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada fin dependerán, por ejemplo, de la gravedad de la enfermedad o la lesión, así como del peso, el sexo, la edad y el estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada se puede conseguir utilizando una experimentación de rutina, que está incluida dentro de la experiencia normal de un médico o un veterinario entrenado.

En una realización, la invención proporciona el uso de un compuesto de hormona de crecimiento o su conjugado en la preparación de un medicamento utilizado en el tratamiento de las enfermedades o estados mencionados anteriormente.

Los compuestos de hormona de crecimiento tal y como se definen y describen en esta memoria en la presente invención, están destinados a ser utilizados como una proteína terapéutica.

La producción de polipéptidos es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir mediante síntesis peptídica clásica, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida, usando química *tert*-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, véase, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 2006.

Los polipéptidos también se pueden producir por un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo.

vo adecuado, en condiciones que permiten la expresión del péptido. Para polipéptidos que comprenden residuos de aminoácidos no naturales, la célula recombinante se debe modificar de tal manera que los aminoácidos no naturales se incorporen en el polipéptido, por ejemplo, mediante el uso de mutantes de ARNt.

5 Los polipéptidos también se pueden producir utilizando sistemas de transcripción/traducción *in vitro* exentos de células. Un polipéptido que contiene nuevos aminoácidos no naturales también se puede producir usando sistemas de supresión que desplazan el marco de lectura o sin sentido, tal y como se describen, p. ej., en J. Am. Chem. Soc. 125, 11782-11783 (2003), Science 301, 964-967 (2003), Science 292, 498-500 (2001), Science 303, 371-373 (2004) y las referencias en los mismos.

10 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células hospedadoras, tal como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con recetas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células se puede recuperar después desde el medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen separar las células hospedadoras del medio mediante centrifugación o filtración. Para obtener productos extracelulares, los componentes proteínicos del material sobrenadante se aíslan mediante filtración, cromatografía en columna o precipitación, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración, precipitación isoelectrónica, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similares, dependiendo del tipo de polipéptido en cuestión. Para obtener productos intracelulares o periplásmicos, las células aisladas del medio de cultivo se desintegran o se permeabilizan y se extraen para recuperar el polipéptido del producto o el precursor del mismo.

15 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido puede ser adecuadamente de origen genómico o ADNc, por ejemplo, obtenida preparando una genoteca genómica o de ADNc y escrutando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del péptido mediante hibridación, usando sondas específicas de ADN o ARN de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el polipéptido también se puede preparar sintéticamente por métodos convencionales establecidos, por ejemplo, el método de fosforamida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1859-1869 (1981), o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3, 801-805 (1984). La secuencia de ADN también se puede preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo, tal y como se describe en el documento US 4.683.202 o Saiki et al., Science 239, 487-491 (1988).

20 La secuencia de ADN que codifica el péptido que se va a expresar se puede insertar en cualquier vector que puede estar sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula hospedadora en la que se va a introducir. Por tanto, el vector puede ser un vector con replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado.

35 El vector puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido está ligada funcionalmente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tales como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra una actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y se puede obtener a partir de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas en la célula hospedadora. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido que se va a expresar en una variedad de células hospedadoras, son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra.

40 La secuencia de ADN que codifica el péptido que se va a expresar también puede estar conectada funcionalmente, si es necesario, a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión.

45 El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedadora o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. Para una fabricación a gran escala, el marcador seleccionable, por ejemplo, puede que no sea resistente a los antibióticos, por ejemplo, los genes de resistencia a antibióticos en el vector se pueden extirpar cuando el vector se utiliza para la fabricación a gran escala. Los métodos para la eliminación de genes de resistencia a antibióticos a partir de vectores son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, el documento de Estados Unidos 6.358.705.

50 Para dirigir el péptido que se va a expresar a la vía secretora de las células hospedadoras, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro-secuencia o pre-secuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras están situadas comúnmente en 5' de la secuencia de

ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la que normalmente está asociada con el péptido o puede ser la de un gen que codifica otra proteína secretada.

5 Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el péptido que se va a expresar, el promotor y opcionalmente la secuencia terminadora y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra).

10 La célula hospedadora en la que se introduce una secuencia de ADN o un vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido en cuestión e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Ejemplos de células hospedadoras adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares de mamífero BHK o CHO. El péptido que se va a expresar también se puede producir mediante el uso de sistemas de transcripción/traducción *in vitro*, conocidos generalmente en la técnica.

La descripción, tal y como se describe en esta memoria, sin limitación de la misma, se describe adicionalmente mediante las siguientes realizaciones.

15 Realización 1. Un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional en comparación con hgG definida en SEQ ID No. 1.

20 Realización 2. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 1, que comprende enlaces disulfuro adicionales entre al menos una de las parejas de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.

25 Realización 3. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 2, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende enlaces disulfuro adicionales entre al menos una de las parejas de aminoácidos en las posiciones correspondientes a A17C/E174C, H21C/M170C, Q84C/Y143C, S71C/S132C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

30 Realización 4. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 1, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.

35 Realización 5. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 4, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C y R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

Realización 6. Un compuesto de hormona de crecimiento que comprende uno o varios enlaces disulfuro adicionales en comparación con la hormona del crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1.

40 Realización 7. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona del crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional entre un segmento de bucle y un segmento de hélice o dentro de un segmento de bucle o entre segmentos de bucle o entre segmentos de hélice.

45 Realización 8. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 6 o 7, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.

50 Realización 9. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 8, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

55 Realización 10. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 9, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, F54C/S144C, F54C/F146C,



## ES 2 542 202 T3

I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

5 Realización 11. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en L3 en una región correspondiente a AA 128-154 en SEQ ID No. 1 o tal como en una región correspondiente a AA 135-148 en SEQ ID No. 1.

Realización 12. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 11, en donde al menos una de las cisteínas del enlace disulfuro adicional está presente en L3 en una posición correspondiente a AA 141, AA142, AA143, AA144, AA145 o AA146, preferiblemente AA143 o AA144 en SEQ ID No. 1.

10 Realización 13. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 12, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

15 Realización 14. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 13, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

20 Realización 15. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 14, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

Realización 16. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con L1.

25 Realización 17. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 16, en donde el compuesto comprende un enlace disulfuro adicional que conecta un residuo de aminoácido correspondiente a AA54, AA55, AA56, AA57, AA58 o AA59 en L3 con un aminoácido correspondiente a AA143 o AA144 en L1 de SEQ ID No. 1.

30 Realización 18. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 16, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C y/o S71 C/S132C en SEQ ID No. 1.

Realización 19. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 18, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C y/o S71C/S132C en SEQ ID No. 1.

35 Realización 20. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1-15, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con un segmento de hélice.

Realización 21. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 20, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con la hélice 2.

40 Realización 22. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 21, en donde el compuesto comprende un enlace disulfuro adicional que conecta un residuo de aminoácido correspondiente a AA84 o AA85 en H2 con un aminoácido correspondiente a AA143 o AA144 en L3 de SEQ ID No. 1.

45 Realización 23. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 21, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C y F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

Realización 24. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 23, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

50 Realización 25. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 24, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.

Realización 26. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde el

## ES 2 542 202 T3

compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L2 con la hélice 1.

Realización 27. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 26, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a D26C/V102C o D26C/Y103C.

5 Realización 28. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la secuencia de polipéptido es al menos 80%, tal como 90%, tal como 95%, tal como 96%, tal como 97%, tal como 98% o tal como 99% idéntica a hGH definida por SEQ ID No. 1.

Realización 29. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la actividad *in vitro* de dicho compuesto es al menos el 5% de la actividad de hGH de tipo silvestre definida por SEQ ID No. 1.

10 Realización 30. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la semivida funcional *in vivo* del polipéptido es 2 veces o mayor que en comparación con la hormona de crecimiento humana.

15 Realización 31. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde la semivida funcional *in vivo* del polipéptido es de 2 a 10 veces mayor que en comparación con la hormona de crecimiento humana.

Realización 32. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona del crecimiento está estabilizado frente a la degradación por proteasa(s), tales como proteasas digestivas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y/o elastasas.

20 Realización 33. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 32, en donde el compuesto está estabilizado frente a la degradación con quimotripsina y/o elastasa.

Realización 34. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en SEQ ID No. 1.

25 Realización 35. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a H21/M170, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C y/o S85C/Y143C en SEQ ID No. 1.

30 Realización 36. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a D26/V102C, D26/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

35 Realización 37. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.

Realización 38. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en SEQ ID No. 1.

40 Realización 39. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 33, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a Q84C/Y143C y/o S85C/Y143C en SEQ ID No. 1.

Realización 40. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde uno o varios enlaces disulfuro se obtienen por sustitución de al menos dos aminoácidos en comparación con SEQ ID No. 1.

45 Realización 41. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto comprende exactamente un enlace disulfuro adicional en comparación con SEQ ID No. 1.

Realización 42. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto comprende exactamente sustituciones de 2 aminoácidos en comparación con SEQ ID No. 1.

50 Realización 43. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende al menos dos cisteínas adicionales en comparación con la hormona de crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1.

Realización 44. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, que

comprende exactamente dos cisteínas adicionales en comparación con la hormona del crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1.

- 5 Realización 45. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente por PEGilación, fijando a las cadenas laterales o a la cadena principal del péptido, polímeros tales como, pero no limitados a, restos de azúcar, ácidos grasos, grupos lipófilos, aglutinantes de albúmina, vitaminas, ácidos biliares, espaciadores.
- Realización 46. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 45, en donde la modificación química del compuesto de hormona de crecimiento es de naturaleza transitoria, es decir, que se puede eliminar fácilmente *in vivo*.
- 10 Realización 47. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 45-46, en donde las modificaciones químicas de residuos de aminoácidos pueden tener lugar en el extremo N-terminal del péptido, en el extremo C-terminal del péptido y/o entre los extremos N-terminal y C-terminal del péptido.
- Realización 48. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 45-47, en donde la modificación química se lleva a cabo en los residuos de aminoácidos Phe1, Gln40, Gln141 o Phe191.
- 15 Realización 49. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 45-48, en donde la modificación química es mediante PEG y en donde PEG tiene entre 500 Da y 50 kDa.
- Realización 50. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1-49, en donde el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente con el fin de facilitar el transporte a través de los epitelios.
- 20 Realización 51. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1-49, en donde el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente con el fin de facilitar el transporte a través de los epitelios cuando se compara con wthGH.
- Realización 52. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1-49, en donde el compuesto de hormona de crecimiento se modifica químicamente con el fin de obtener una semivida funcional prolongada *in vivo* en comparación con wthGH.
- 25 Realización 53. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 52, en donde la semivida funcional *in vivo* de dicho compuesto de hormona de crecimiento es 2 veces o mayor que en comparación con hGH.
- Realización 54. Un compuesto de hormona de crecimiento según la realización 53, en donde la semivida funcional *in vivo* es de 2 a 10 veces en comparación con hGH.
- 30 Realización 55. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 45-49, en donde la modificación química se lleva a cabo en residuos de aminoácidos que no interfieren con la unión del compuesto de hormona de crecimiento con el hGHR.
- Realización 56. Un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 49-55, en donde el compuesto de hormona de crecimiento está estabilizado frente a la degradación proteolítica con proteasas, tales como proteasas digestivas, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y/o elastasas.
- 35 Realización 57. Un método para preparar un compuesto de hormona de crecimiento con una estabilidad incrementada frente a la degradación proteolítica, cuyo método comprende una etapa de
- a. introducir enlaces disulfuro adicionales en hGH.
- 40 Realización 58. Un método para preparar un compuesto de hormona de crecimiento con una estabilidad incrementada frente a la degradación proteolítica según cualquiera de las realizaciones 1-14, cuyo método comprende una etapa de
- a. introducir enlaces disulfuro adicionales en hGH mediante la sustitución de uno o varios residuos de aminoácidos en hGH con una o varias cisteínas.
- 45 Realización 59. Un método para preparar un compuesto de hormona de crecimiento con una estabilidad incrementada frente a la degradación proteolítica según las realizaciones 1-14, que comprende las etapas de
- a. introducir enlaces disulfuro adicionales en hGH mediante la adición de uno o varios residuos de cisteína.
- Realización 60. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56 y un(os) vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s).
- 50 Realización 61. Una composición farmacéutica según la realización 60, en donde dicha composición se puede administrar a través de administración lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal,

pulmonar, epidérmica, dérmica, transdérmica, y parenteral a los pacientes.

Realización 62. Una composición farmacéutica según la realización 60 o 61, en donde dicha composición es una composición administrada oralmente.

5 Realización 63. Un método para preparar una composición farmacéutica, en donde dicha composición comprende un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56 y un(os) vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s).

Realización 66. Una hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56, para uso como medicamento.

10 Realización 68. Uso de un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

Realización 69. Una hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56 para uso en el tratamiento de una enfermedad que se selecciona a partir de carencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (SPW); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/HALS); niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); poca estatura en niños con muy bajo peso al nacer (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; poca estatura idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en huesos largos o de los mismos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso y dedos; fracturas en huesos esponjosos o de los mismos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base de los pies; pacientes después de una cirugía del tendón o del ligamento, por ejemplo, de la mano, la rodilla o el hombro; pacientes que tienen o que están experimentando una osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o de disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material osteosintético, tal como clavos, tornillos y placas; pacientes con falta de unión o mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de la tibia o el primer dedo del pie; pacientes después del implante de un injerto; degeneración del cartílago articular en la rodilla causado por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos con diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a una malnutrición en APCD; inversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; VIH en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Chron; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/drogas o trauma neurológico; envejecimiento; ancianos débiles; osteoartritis; cartílago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; o baja estatura debido a un tratamiento con glucocorticoides en niños.

35 Realización 70. Uso de un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las realizaciones 1 a 56 en la preparación de un medicamento para ser utilizado en el tratamiento de carencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (SPW); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/HALS); niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); poca estatura en niños con muy bajo peso al nacer (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; poca estatura idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en huesos largos o de los mismos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso y dedos; fracturas en huesos esponjosos o de los mismos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base de los pies; pacientes después de una cirugía del tendón o del ligamento, por ejemplo, de la mano, la rodilla o el hombro; pacientes que tienen o que están experimentando una osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o de disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material osteosintético, tal como clavos, tornillos y placas; pacientes con falta de unión o mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de la tibia o el primer dedo del pie; pacientes después del implante de un injerto; degeneración del cartílago articular en la rodilla causado por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos con diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a una malnutrición en APCD; inversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; VIH en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Chron; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/drogas o trauma neurológico; envejecimiento; ancianos débiles; osteoartritis; cartílago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; o baja estatura debido a un tratamiento con glucocorticoides en niños.

60 **Ejemplos**

La invención se define adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que describen la preparación y la caracterización de los diversos compuestos descritos en este documento y los métodos para someter a ensayo su actividad biológica. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden poner en práctica muchas modificaciones, tanto de los materiales como de los métodos, sin apartarse del alcance de la invención.

- 5 La TGasa utilizada en los ejemplos es transglutaminasa microbiana procedente de *Streptovercillium mobaraense* de acuerdo con el documento US5156956.

#### **Ejemplo 1: Método general para la preparación de compuestos de hGH.**

El gen que codifica el compuesto de hormona de crecimiento se insertó de forma recombinante en un vector plasmídico. Mutaciones de cisteínas se introdujeron usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene).  
10 Una cepa adecuada de *E. coli* se transformó posteriormente utilizando el vector plasmídico. La proteína se expresó como una proteína soluble con un marcador peptídico rico en histidina N-terminal, adecuado para la purificación mediante cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado.

El concentrado celular se preparó en 50% de glicerol y se almacenó a -80°C. La cepa de concentrado de glicerol se inoculó en placas de LBA y posteriormente se incubó a 37°C durante una noche. El contenido de cada placa se lavó con medio LB y se diluyó en 500 ml de medio LB+AMP para la expresión. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 220 rpm hasta que se alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,6. Una inducción con éxito se realizó empleando IPTG 0,2 mM a 30°C durante 6 horas, proporcionando una DO<sub>600</sub> final de 2,0. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación.

Las células se suspendieron a continuación en Tris-HCl 20 mM, pH 8,5 y se destruyeron usando un alterador celular a 30 kPSI. El material sobrenadante se recogió por centrifugación y posteriormente se sometió a purificación cromatográfica.

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad sobre metal inmovilizado como etapa de captura, seguida de una eliminación del marcador peptídico usando di-amino-peptidasa de Unizyme. La purificación final se logró mediante cromatografía de intercambio iónico. La purificación también se podía lograr empleando, pero no limitada a, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y técnicas de separación basadas en membranas, conocidas por una persona experta en la técnica.

Los grupos PEGs se fijaron al extremo N-terminal haciendo reaccionar el compuesto de hGH con 2 equivalentes de, por ejemplo, Peg-5000-aldehído (RAPP Polymere, 12 5000-6). La reacción se inició mediante la adición de NaCNBH<sub>3</sub> en 0,5 ml de MeCN en 10 etapas. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 20 h.

Los grupos PEGs se fijaron a Q40 haciendo reaccionar primero el compuesto de hGH con 1,3-diamino-2-propanol (Fluka 33262) utilizando transglutaminasa microbiana como catalizador.

#### Acoplamiento del compuesto de hGH transaminado y oxidado (I) con un grupo mPEG.

Se prepararon las siguientes soluciones:

35 Tampón A: trietanolamina (119 mg, 0,8 mmol) se disolvió en agua (40 mL) y el pH se ajustó a 8,5.

Tampón B: trietanolamina 20 mM; NaCl 0,2 M.

#### **(A) Transaminación de hGH (III) con 1,3-diamino-2-propanol**

hGH (8,64 g) se disolvió en tampón A (500 mL) con agitación. A esta solución se añadió lentamente una mezcla de 1,3-diamino-2-propanol (DAP) (8,1 g, Fluka 33262) en tampón A (50 mL). El pH de la mezcla resultante se ajustó a 8,5 mediante la adición de HCl ac. La mTGasa (2,8 mL, 1,3 mg/mL) se añadió mientras se mezclaba. La mezcla final se agitó durante una noche a TA.

La mezcla de reacción se diluyó con tampón A (1,2 L) y el producto se purificó por cromatografía de intercambio iónico. 100 mL/min - 200 ml/frac.

Tampón B de la etapa 40% - gradiente de 40-100% del tampón B durante 15 CV = 225 min.

#### 45 **(B) Oxidación de hGH transaminada**

Tampón A: trietanolamina (119 mg, 0,8 mmol) se disolvió en agua (40 mL) y el pH se ajustó a 8,5.

Tampón B: 3-metiltilio-1-propanol (725 mg, 7,1 mmol) se disolvió en tampón A (10 mL).

Tampón C: HEPES (5,96 g) se disolvió en agua (1,0 L) y el pH se ajustó a 7,0

Periodato: NaIO<sub>4</sub> (48,1 mg, 0,225 mmol) se disolvió en agua (1,0 ml).

A una solución de hGH que había reaccionado con DAP (10 mg, 0,5  $\mu$ mol) se añadió tampón B (0,2 ml) seguido de la solución de periodato (0,03 ml). Después de 20 min de incubación en frío, la mezcla se dializó 4 veces con tampón C. El residuo se concentró hasta 1 ml.

**(C) Aminación reductora de hGH oxidado con reactivo de PEG.**

- 5 La solución final procedente de (B) (1 mL, 0,45  $\mu$ mol) se mezcló con una solución de PEG-amina (2 mL, 0,3 mmol) en tampón HEPES 25 mM pH 7,0 y la mezcla resultante se hizo rotar lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 1 h, se añadió NaCNBH<sub>3</sub> (100  $\mu$ L de una solución de NaCNBH<sub>3</sub> (20 mg) en agua (0,5 mL)) en porciones (10x). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18-24 horas. La mezcla se purificó en una MonoQ, el tampón se cambió y se concentró. Los reactivos de mPEG-amina están disponibles comercialmente.

**Ejemplo 2: Caracterización química de las proteínas de compuestos de hormona de crecimiento purificados.**

La proteína purificada intacta se analizó mediante MALDI-MS. La masa observada se correspondía a la masa teórica deducida de la secuencia de aminoácidos.

- 15 El enlace esperado de los tres enlaces disulfuro en cada compuesto se demostró mediante cartografiado de péptidos usando tripsina y digestión con AspN, seguido por análisis MALDI-MS del material digerido antes y después de la reducción de los enlaces disulfuro con DTT.

**Ejemplo 3: Análisis de la actividad biológica de los compuestos de hormona de crecimiento purificados.**

La actividad biológica de los compuestos de hGH se midió en un ensayo de proliferación de la potencia del receptor basado en células, a saber, un ensayo BAF. El método es general para los compuestos de hGH.

- 20 Las células BAF-3 (una línea celular linfocítica pro-B de murino obtenida a partir de la médula ósea) es dependiente de IL-3 para el crecimiento y la supervivencia. IL-3 activa JAK-2 y STAT que son los mismos mediadores, GH se activa después de la estimulación.

- 25 Las células BAF-3 fueron transfectadas con un plásmido que contenía el receptor de hGH. Los clones que eran capaces de proliferar después de la estimulación con hGH, se convirtieron en líneas celulares dependientes de hGH, denominadas en lo sucesivo BAF3-GHR. Las líneas celulares responden a GH con un patrón de crecimiento relacionado con la dosis y por lo tanto pueden ser utilizadas para evaluar el efecto de diferentes compuestos de hGH en un ensayo de proliferación.

- 30 Las células BAF-3GHR se cultivan en medio de inanición (medio de cultivo sin GH) durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se centrifugan, el medio se retira y las células se resuspenden en medio de inanición a 2,22 x 10<sup>5</sup> células/ml. Se siembran porciones de 90  $\mu$ l de material sobrenadante celular en placas de microtitulación (96 pocillos NUNC-clone). Se añaden diferentes concentraciones de compuesto de hormona de crecimiento a las células, y las placas se incuban durante 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

- 35 AlamarBlue es un indicador redox, AlamarBlue<sup>®</sup> (BioSource n° de cat. Dal 1025) que se reduce por reacciones innatas del metabolismo celular y, por lo tanto, proporciona una medida indirecta del número de células viables. El AlamarBlue<sup>®</sup> se diluye 6 veces (5  $\mu$ l de AlamarBlue<sup>®</sup> + 25  $\mu$ l de medio de inanición) y 30  $\mu$ l de AlamarBlue<sup>®</sup> diluido se añaden a cada pocillo. Las células se incuban a continuación durante otras 4 horas. Finalmente la actividad metabólica de las células es medida en un lector de placas con fluorescencia utilizando un filtro de excitación de 544 nM y un filtro de emisión de 590 nM.

- 40 El resultado para un compuesto dado se expresa como la relación entre la CE<sub>50</sub> de dicho compuesto y la CE<sub>50</sub> de wthGH que migraba en paralelo. En la Tabla 6 a continuación se proporcionan resultados adicionales.

**Tabla 2**

Valores de CE <sub>50</sub> para compuestos de hGH en relación con el valor de CE <sub>50</sub> de hGH		
Compuesto Cys	Promedio	Desv
A17C-E174C	0,6	0,1
H21C-M170C	0,4	0,3
R94C-D107C	0,8	0,4
Q84C-Y143C	0,3	0,1
S71C-S132C	0,24	0,02

Todos los compuestos de hGH sometidos a ensayo eran equipotentes con una potencia igual o superior a la de

wthGH.

Tabla 2A

Valores de CE <sub>50</sub> para compuestos de hGH con un grupo PEG en relación con el valor de CE <sub>50</sub> de hGH	
COMPUESTO	RELACIÓN ENTRE CE <sub>50</sub> Y BAF (compuesto hGH/hGH wt)
HGH	1,0
HGH (Q84C,Y143C) Q40-PEG5000	0,75
HGH (Q84C,Y143C) N-TERM PEG750	0,475
HGH (Q84C,Y143C) N-TERM PEG5000	1,1475

**Ejemplo 3A. Estudio de dosis-respuesta *in vivo* en ratas Sprague Dawley hipofisectomizadas (ensayo 3A)**

- 5 Se estudió la relación dosis-respuesta *in vivo* en ratas macho Sprague Dawley hipofisectomizadas. La rata hipofisectomizada es un modelo animal bien conocido y reconocido de la carencia de hormona de crecimiento, en donde la falta de producción de hormona de crecimiento tiene lugar después de la extirpación quirúrgica de la glándula pituitaria. Esto también conduce a bajos niveles circulantes de factor de crecimiento-1 similar a insulina (IGF-1) otra característica clínica importante de la carencia de hormona de crecimiento en seres humanos.
- 10 La hipofisectomía se realizó en ratas macho de 4 semanas de edad que pesaban 90-100 g. Los animales entraron en el estudio 3-4 semanas después de la cirugía, pesando 100-110 g. Los animales que aumentaron su peso corporal en más de un 10% durante las 3-4 semanas después de la cirugía, no se les permitió entrar en el estudio.
- 15 Setenta ratas Sprague Dawley hipofisectomizadas fueron asignadas aleatoriamente a siete grupos de dosificación con diez animales en cada grupo. Un grupo recibió solo vehículo y sirvió como grupo control sin tratamiento. Tres grupos recibieron compuesto del ensayo (hGH Q84C,Y143C) 33, 3,3 y 0,33 nmol respectivamente, y tres grupos recibieron hGH como comparador, 50, 5,0 y 0,5 nmol respectivamente. Los compuestos y el vehículo se administraron como una dosis única subcutánea en el cuello. El peso corporal se midió a diario entre 8-10 a.m., durante una semana.
- 20 Tanto hGH Q84C,Y143C como hGH inducían un aumento dependiente de la dosis del peso corporal, cuando el peso corporal el Día 0 se comparaba con el del Día 7.
- 25 Una ecuación sigmoidea de dosis-respuesta se ajustó a los datos experimentales (aumento del peso corporal entre los Días 0-7) mediante análisis de regresión no lineal con el fin de calcular estimaciones de parámetros de E<sub>max</sub>, E<sub>0</sub> y ED<sub>50</sub>. La ecuación era una ecuación integrada sigmoidea de dosis-respuesta en GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (Programa informático de GraphPad Inc, San Diego, EE.UU.). Los datos que incluyen estimaciones de los parámetros e intervalos de confianza del 95% se presentan en la Tabla 3.
- No se observaron diferencias en las estimaciones de los parámetros de E<sub>0</sub> y E<sub>max</sub> para hGH Q84C,Y143C y hGH. Sin embargo ED<sub>50</sub> era significativamente menor para hGH Q84C,Y143C en comparación con hGH, lo que indica un aumento de la potencia *in vivo* de hGH Q84C,Y143C.

Tabla 3

La respuesta como aumento del peso corporal el Día 7 en comparación con el Día 0 se ajustó a una ecuación de dosis-respuesta sigmoidea con el fin de estimar E <sub>max</sub> , E <sub>0</sub> y ED <sub>50</sub> .		
	hGH Q84C,Y143C	hGH wt
E <sub>0</sub> (g)	0,0	0,2
	(-1,9 - 1,8)	(-1,7 - 2,0)
ED <sub>50</sub> (nmol)	0,29	0,70
	(0,20 - 0,41)	(0,50 - 0,99)
E <sub>max</sub> (g)	26,3	27,5
	(24,8 - 27,9)	(25,9 - 29,1)
Media (95% de intervalo de confianza)		

30

**Ejemplo 4. Estudios de interacción con el receptor mediante análisis de resonancia de plasmón superficial.**

La interacción del receptor de compuestos de hGH se analizó usando análisis de resonancia de plasmón superficial. El método es general para los compuestos de hGH y se ejemplifica con el compuesto hGH Q84C/Y143C.

La interacción de hGH y análogos con la proteína que se une a hGH (hGHBP) se estudió mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare, Suecia). El AcMo anti-hGH (Fitzgerald Industries International, EE.UU., nº 10G05B) se inmovilizó sobre un chip CM-5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, normalmente a un nivel de 5000 RU. wthGH o sus análogos fueron capturados a 10-25 µg/ml en tampón de migración (HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 30 mM, 0,05% de tensioactivo P20, pH 7,4), lo que dio como resultado ligando capturado a 250-400 RU. La hGHBP se inyectó posteriormente a una concentración de 0-800 nM sobre la superficie a 30 µl/min. Una superficie con AcMo anti-hGH inmovilizado pero sin hGH capturada se utilizó como referencia.

Los datos cinéticos se analizaron con el programa informático de Biacore® Evaluation 2.0 con el modelo de unión de Langmuir 1:1.

El análisis mostraba (Tabla 4) que hGH Q84C,Y143C tenía una afinidad similar o ligeramente superior hacia la proteína que se une a la hormona de crecimiento, que wthGH.

**Tabla 4**

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
hGH wt	1,9x10 <sup>5</sup>	6,1x10 <sup>-4</sup>	3,3
hGH Q84C,Y143C	2,0x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>-4</sup>	2,5

El análisis mostraba (Tabla 4A) que hGH Q84C,Y143C era equipotente con hGH de tipo silvestre dentro del error experimental.

**Tabla 4A**

	Ec50 ± desv. est. (nM)
hGH wt	0,7, ± 0,3
hGH Q84C,Y143C	0,3 ± 0,1

#### **Ejemplo 5. Ensayo para medir la tasa de degradación por proteasas de compuestos de hGH y de hGH de tipo silvestre**

El compuesto de interés es digerido por una proteasa relevante (tripsina, quimotripsina, pepsina, elastasa, factor VIIa, factor Xa, proteinasa K, carboxipeptidasa, DPPIV, endopeptidasa neutra, granzima B, prolina-endopeptidasa, peptidasa estafilocócica I, termolisina, trombina, proteinasa Arg-C, endopeptidasa Asp-N, caspasa 1-10, clostripaína, enterocinasa, glutamil endopeptidasa, granzima B, LysC, LysN, prolina-endopeptidasa y peptidasa estafilocócica I o extractos tisulares) en un tampón apropiado (por ejemplo, PBS o bicarbonato de amonio) a 37°C durante un máximo de hasta 24 horas. La degradación proteolítica se evalúa mediante un ensayo de HPLC.

#### **Método General**

##### *Digestión proteolítica:*

Cien µL de solución del compuesto del ensayo a 1 mg/ml en tampón de bicarbonato de amonio, se degrada con la enzima durante hasta 24 horas a 37°C. Se toman submuestras en diversos momentos y la reacción proteolítica se detiene mediante acidificación de la muestra diluyendo 10 veces en 1% de TFA. Estas muestras diluidas se analizan mediante HPLC de fase inversa para estimar el grado de digestión proteolítica.

##### *Método HPLC:*

Se inyectan 10 µL de la solución anterior en una columna de fase inversa Vydac C4 de 2x150 mm que se eluye con un gradiente lineal de 0,1% de TFA en agua hasta 100% de acetonitrilo que contiene 0,1% de TFA, durante un periodo de 30 min con un caudal de 0,2 ml/min. La detección de los picos se realiza a 214 nm de absorción de UV. El % de compuesto intacto en el momento t = T, se calcula a partir del área del pico en el momento t = T (A<sub>T</sub>) y el área del pico en t = 0 (A<sub>0</sub>) como (A<sub>T</sub>/A<sub>0</sub>) × 100%. Los resultados proporcionados en la tabla 6 a continuación se obtuvieron después de 4 horas (T=4 en la ecuación anterior).

El % de compuesto intacto se representa gráficamente en función del tiempo utilizando el programa informático GraphPad Prims ver. 5.01. T½ se calcula como una fase de desintegración también por el programa informático GraphPad Prism.



Las enzimas usadas en el ejemplo son elastasa (Sigma, de páncreas porcino) y quimotripsina (Roche, grado de secuenciación). El tampón es bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,5.

**Ejemplo 5.1**

Se incubaron 100 µg de wthGH en 100 µL de tampón con 13 ng de quimotripsina. T<sub>1/2</sub> = 3,6 horas.

5 **Ejemplo 5.2**

Se incubaron 100 µg de wthGH en 100 µL de tampón con 135 ng de elastasa. T<sub>1/2</sub> = 1,6 horas.

**Ejemplo 5.3**

Se incubaron 100 µg de hGH Q84C,Y143C en 100 µL de tampón con 135 ng de elastasa. T<sub>1/2</sub> = 6,2 horas.

**Ejemplo 5.4**

10 Se incubaron 100 µg de hGH A17C,E174C en 100 µL de tampón con 13 ng de quimotripsina. T<sub>1/2</sub> = 7,5 horas.

**Ejemplo 5.5**

Se incubaron 100 µg de hGH H21C,M170C en 100 µL de tampón con 13 ng de quimotripsina. T<sub>1/2</sub> = 22 horas

**Ejemplo 5.6**

Se incubaron 100 µg de hGH R94C,D107C en 100 µL de tampón con 13 ng de quimotripsina. T<sub>1/2</sub> = 2,5 horas.

15 **Ejemplo 5.7**

Se incubaron 100 µg de hGH Q84C,Y143C en 100 µL de tampón bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,5 con 13 ng de quimotripsina. T<sub>1/2</sub> no se calculó porque no se observó degradación

**Tabla 4** T<sub>1/2</sub> (horas) para la degradación de hGH de tipo silvestre y compuestos mediante quimotripsina

Compuesto	T <sub>1/2</sub>
hGH wt	3,6
hGH A17C,E174C	7,5
hGH H21C,M170C	22
hGH R94C,D107C	2,5
hGH Q84,Y143C	N/A

20 **Tabla 5** T<sub>1/2</sub> (horas) para la degradación de hGH de tipo silvestre y el compuesto hGH Q84C,Y143C mediante elastasa.

Compuesto	T <sub>1/2</sub>
hGH wt	1,6
hGH Q84C,Y143C	6,2

**Ejemplo 6** Análisis de los compuestos seleccionados mediante el ensayo BAF y digestión proteolítica tal y como se describe en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 5

25 **Tabla 6.** Análisis de compuestos de hormona de crecimiento que comprenden enlaces disulfuro adicionales.

Compuesto	Relación entre EC50 y BAF (compuesto hGH/hGH) de	Estabilidad frente a quimotripsina Compuesto intacto (%)	Estabilidad frente a elastasa Compuesto intacto (%)	Dominios enlazados por un puente disulfuro adicional
HGH	1,0	42	25	
HGH (A17C E174C)	0,6	45	10	H1-H4
HGH (H21C M170C)	0,5	72	10	H1-H4
HGH (D26C,V102C)	0,5	55	65	H1-L2

Compuesto	Relación entre EC50 y BAF (compuesto hGH/hGH) de	Estabilidad frente a quimotripsina Compuesto intacto (%)	Estabilidad frente a elastasa Compuesto intacto (%)	Dominios enlazados por un puente disulfuro adicional
HGH (D26C,Y103C)	0,5	55	45	H1-L2
HGH (F54C,Y143C)	0,6	55	20	L1-L3
HGH (F54C,S144C)	0,5	60	20	L1-L3
HGH (F54C, F146C)	0,6	40	25	L1-L3
HGH (S55C,Y143C)	0,5	90	25	L1-L3
HGH (S57C,Y143C)	0,3	75	50	L1-L3
HGH (I58C Q141C)	0,7	70	25	L1-L3
HGH (I58C,Y143C)	0,6	55	20	L1-L3
HGH (I58C,S144C)	1,2	65	30	L1-L3
HGH (P59C Q137C)	0,7	72	35	L1-L3
HGH (S71C S132C)	0,2	90	45	L1-L3
HGH (L81C,Y143C)	0,7	85	15	H2-L3
HGH (Q84C Y143C)	0,5	100	80	H2-L3
HGH (S85C Y143C)	0,5	80	70	H2-L3
HGH (S85C, S144C)	0,7	81	60	H2-L3
HGH (F92C,T148C)	0,6	40	55	H2-L3
HGH (R94C D107C)	0,8	38	70	H2-H3

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Novo Nordisk A/S  
Demuth, Helle  
Schjødt, Christine B  
Breinholt, Jens  
Olsen, Ole H  
Thygesen, Peter  
Nørskov-Lauritsen, Leif
- 10 <120> Compuestos de hormona de crecimiento estables
- <130> 7878.204-WO
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1  
< 211> 191  
< 212> PTA  
< 213> Hormona de Crecimiento Humana
- 20 <220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (6)..(35)  
< 223> Hélice 1
- <220>  
< 221> MISC\_FEATURE

< 222> (36)..(71)  
< 223> Bucle 1

5  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (72)..(98)  
< 223> Hélice 2

10  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (99)..(106)  
< 223> Bucle 2

15  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (107)..(127)  
< 223> Hélice 3

20  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (128)..(154)  
< 223> Bucle 3

20  
<220>  
< 221> MISC\_FEATURE  
< 222> (155)..(184)  
< 223> Hélice 4

ES 2 542 202 T3

<400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
 1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
 20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
 165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 180 185 190

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de hormona de crecimiento que comprende un enlace disulfuro adicional en comparación con hGH definida por SEQ ID No. 1.
- 5 2. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 1, en donde la secuencia de polipéptidos de la hormona de crecimiento es al menos 80% idéntica a hGH definida por SEQ ID No. 1.
3. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 1, en donde la secuencia de polipéptidos de la hormona de crecimiento es al menos 95% idéntica a hGH definida por SEQ ID No. 1.
4. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional entre un segmento de bucle y un  
10 segmento de hélice o dentro de un segmento de bucle o entre segmentos de bucle o entre segmentos de hélice.
5. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en SEQ ID No. 1.
6. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 5, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No. 1.
7. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en el bucle 3 (L3) que se corresponde a AA 128-154 en SEQ ID No. 1.
8. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 7, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en una región correspondiente a AA 135-148 en SEQ ID No. 1.
9. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 7, en donde el compuesto comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C y/o F92C/T148C en SEQ ID No. 1.
10. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 7, en donde el compuesto de hormona de crecimiento comprende un enlace disulfuro adicional que conecta L3 con la hélice 2 (H2) o el bucle 1 (L1).
11. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 10, en donde el compuesto comprende un enlace disulfuro adicional que conecta un residuo de aminoácidos correspondiente a AA84 o AA85 en H2 con un aminoácido correspondiente a AA143 o AA144 en L3 de SEQ ID No. 1.
12. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento está estabilizado frente a la degradación con proteasa(s).
13. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 12, en donde la proteasa es una proteasa digestiva.
14. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 13, en donde la proteasa digestiva se selecciona a partir de: pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa.
15. El compuesto de hormona de crecimiento según la reivindicación 12, en donde el polipéptido comprende al menos una pareja de mutaciones correspondiente a H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en SEQ ID No.1.
16. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende exactamente dos cisteínas adicionales en comparación con la hormona de crecimiento humana tal y como se define en SEQ ID No. 1.
17. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde

el compuesto de hormona de crecimiento es una proteína de fusión.

18. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento está modificado químicamente.

5 19. El compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto de hormona de crecimiento está modificado químicamente a través de restos que se fijan a las cadenas laterales o a la cadena principal del compuesto de hormona de crecimiento, tales como PEGs, carbohidratos, aglutinantes de albúmina, ácidos grasos, cadenas de alquilo, grupos lipófilos, vitaminas, ácidos biliares o espaciadores.

10 20. Un método para preparar un compuesto de hormona de crecimiento con una estabilidad incrementada frente a la degradación proteolítica, en donde el método comprende una etapa de

a. introducción de enlace(s) disulfuro adicional(es) en hGH tal y como se define en SEQ ID No. 1.

21. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de hormona de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y un(unos) vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s).

15 22. La composición farmacéutica según la reivindicación 21, en donde la composición es para administración oral.

23. Un compuesto según las reivindicaciones 1 a 19, para uso como medicamento.

24. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para uso en el tratamiento de enfermedades o estados en donde el paciente se beneficiará de un incremento de la cantidad de hormona de crecimiento circulante.

20 25. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 19, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o estados en donde el paciente se beneficiará de un incremento de la cantidad de hormona de crecimiento circulante.

25 26. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para uso en el tratamiento de una carencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (SPW); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/HALS); niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); poca estatura en niños con muy bajo peso al nacer (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; poca estatura idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en huesos largos o de los mismos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso y dedos; fracturas en huesos esponjosos o de los mismos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base de los pies; pacientes después de una cirugía del tendón o del ligamento, por ejemplo, de la mano, la rodilla o el hombro; pacientes que tienen o que están experimentando una osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o de disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material osteosintético, tal como clavos, tornillos y placas; pacientes con falta de unión o mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de la tibia o el primer dedo del pie; pacientes después del implante de un injerto; degeneración del cartilago articular en la rodilla causado por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos con diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a una malnutrición en APCD; inversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; VIH en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Chron; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/drogas o trauma neurológico; envejecimiento; ancianos débiles; osteoartritis; cartilago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; o baja estatura debido a un tratamiento con glucocorticoides en niños.

30  
35  
40  
45

27. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 a 19, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una carencia de hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (SPW); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/HALS); niños nacidos pequeños para su edad gestacional (SGA); poca estatura en niños con muy bajo peso al nacer (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; poca estatura idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en huesos largos o de los mismos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso y dedos; fracturas en huesos esponjosos o de los mismos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base de los pies; pacientes después de una cirugía del tendón o del ligamento, por ejemplo, de la mano, la rodilla o el hombro; pacientes que tienen o que están experimentando una osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o de disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro,

50  
55

5 codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material osteosintético, tal como clavos, tornillos y placas; pacientes con falta de unión o mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de la tibia o el primer dedo del pie; pacientes después del implante de un injerto; degeneración del cartílago articular en la rodilla causado por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos con diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada a una malnutrición en APCD; inversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; VIH en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Chron; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome de intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor  
10 electiva, desintoxicación de alcohol/drogas o trauma neurológico; envejecimiento; ancianos débiles; osteoartritis; cartílago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; o baja estatura debido a un tratamiento con glucocorticoides en niños.

Figura 1

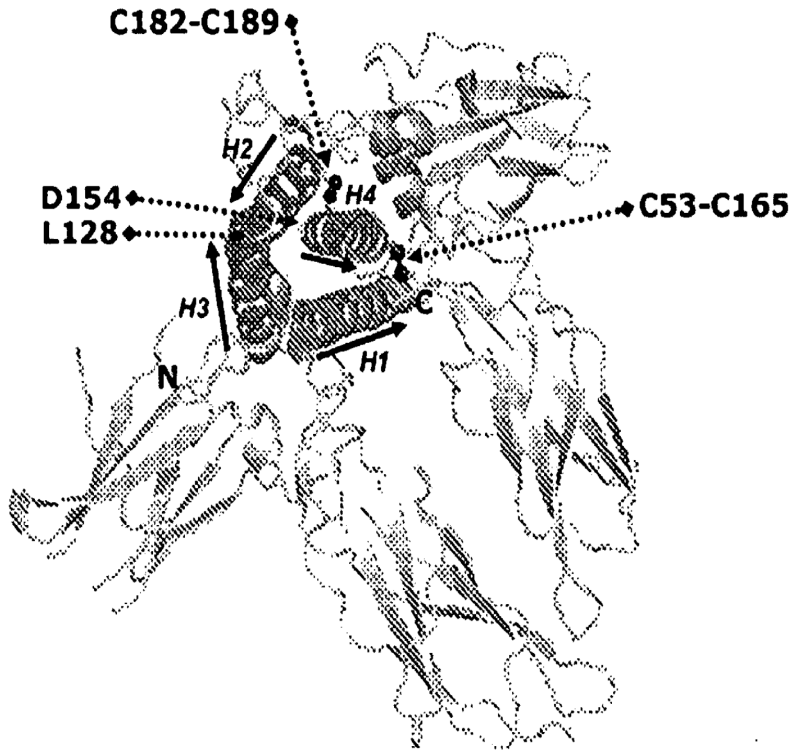




Figura 2

```

1  FPTIPESRLP DNAMLRARHL HCLAPDYGE KEERIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT
      H1 L1
61  PSNREETQOK SNEELLRTSL LUIQSNLEPV QPERSVFANS LVIYASDSNV YDELKDLERG
      H2 L2 H3
121 IQTLMGHLED GSPRTGQIFK QTYSKPDNS HNDDALLKRY GELYGERKDM DKVETELRIV
      L3 H4
181 QCRSVEGSCG F
    
```

Figura 3A

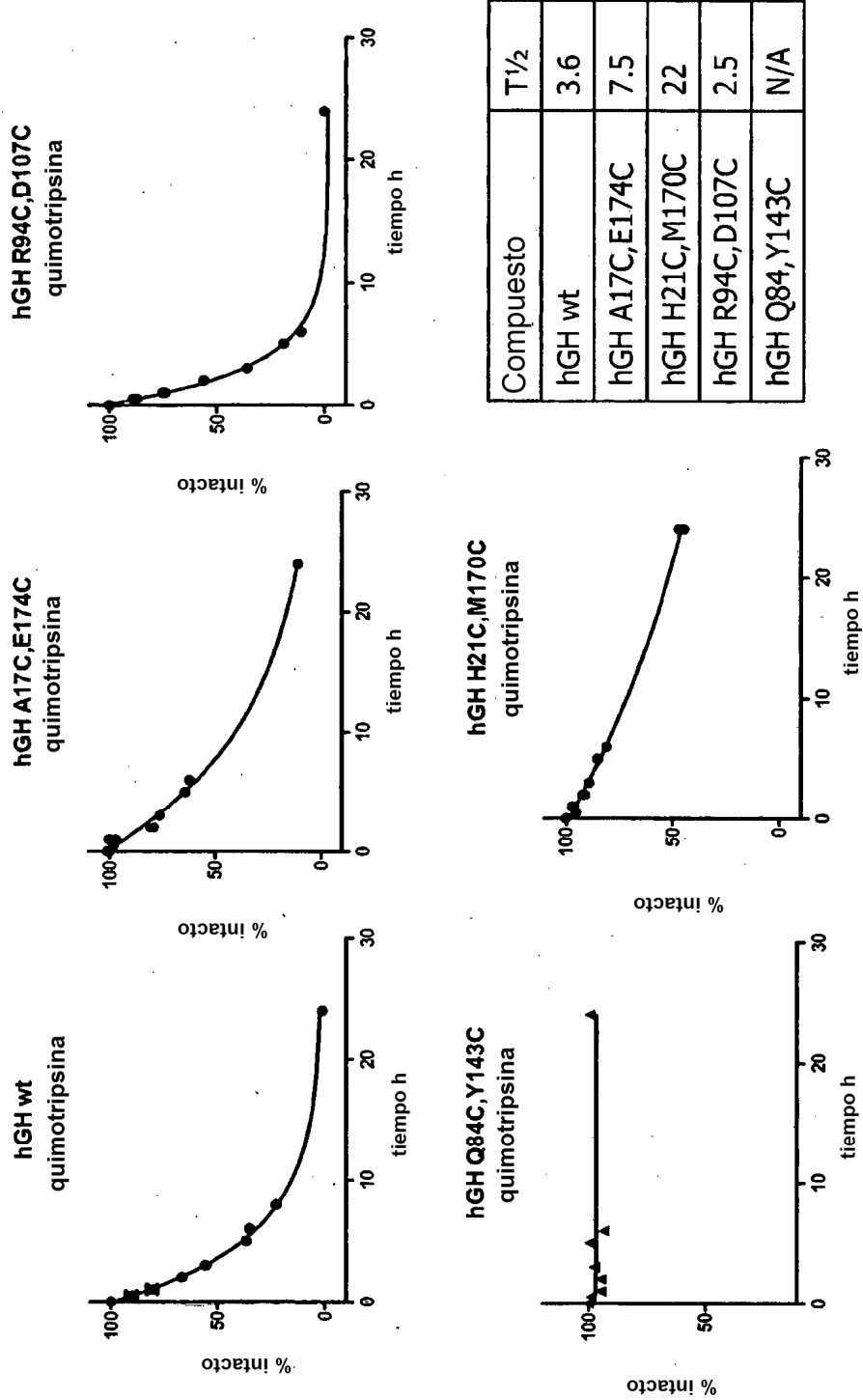
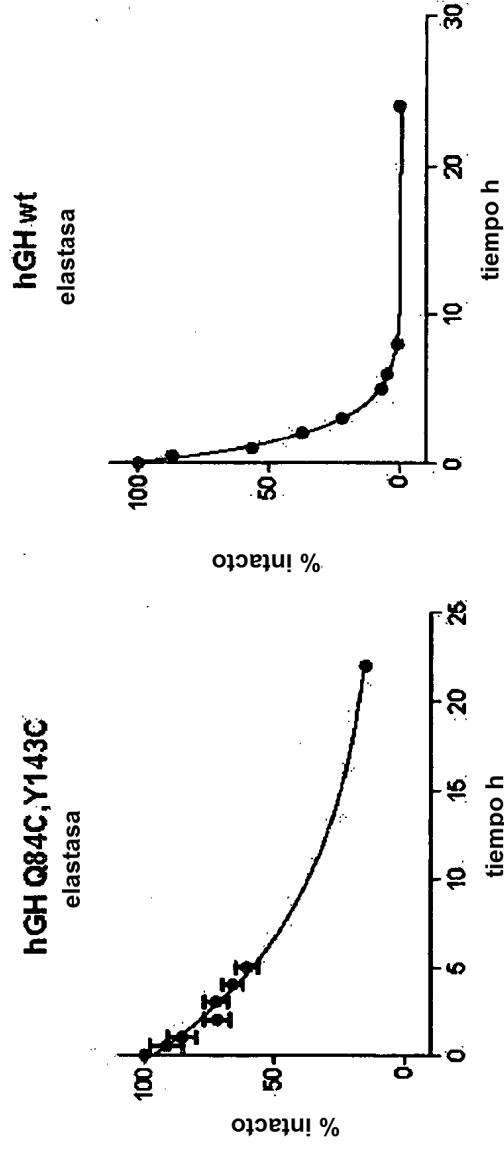


Figura 3B



Compuesto	T <sub>1/2</sub>
hGH wt	1.6
hGH Q84C, Y143C	6.2