

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 400**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2009 PCT/EP2009/055194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09738181 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2279007**

54 Título: **Compuestos de hormona de crecimiento humana recombinante pegilada**

30 Prioridad:

29.04.2008 EP 08155408

22.08.2008 EP 08162865

22.10.2008 EP 08167289

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

24.10.2016

73 Titular/es:

**ASCENDIS PHARMA GROWTH DISORDERS
DIVISION A/S (100.0%)
Tuborg Boulevard 12
2900 Hellerup, DK**

72 Inventor/es:

**RAU, HARALD;
KINDERMANN, SUSANNE;
LESSMANN, TORBEN;
RASMUSSEN, GRETHE NØRSKOV;
HERSEL, ULRICH;
WEGGE, THOMAS y
SPROGØE, KENNETT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 587 400 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 hormona de crecimiento humana recombinante pegilada

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende excipientes farmacéuticos adecuados y que comprende también una cantidad clínicamente eficaz de un profármaco pegilado de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) que puede administrarse con menos frecuencia que los productos de hormona de crecimiento humana disponibles y puede no provocar lipoatrofia en el lado de la inyección. La presente invención también se refiere a tales profármacos.

Antecedentes de la técnica

- 10 La hormona de crecimiento (GH) es una hormona que estimula el crecimiento y la reproducción celular en seres humanos y otros animales. Es una hormona polipeptídica monocatenaria, de 191 aminoácidos que se sintetiza, se almacena y se secreta por las células somatotropas dentro de las alas laterales de la hipófisis anterior. La hormona también se conoce como somatotropina cuando se hace referencia a la hormona de crecimiento producida mediante tecnología de ADN recombinante, y se abrevia como "rhGH".
- 15 La hormona de crecimiento tiene una variedad de funciones en el cuerpo, de las cuales la más notoria es el aumento de la altura en toda la infancia, y existen varias enfermedades que pueden tratarse a través del uso terapéutico de GH.

- 20 Los efectos de la deficiencia de hormona de crecimiento varían dependiendo de la edad a la que se producen. En niños, el retraso del crecimiento y la talla baja son las principales manifestaciones de la deficiencia de GH. También puede provocar inmadurez sexual. En adultos, los efectos de la deficiencia son más sutiles, y pueden incluir deficiencias de fuerza, energía y masa ósea, así como aumento del riesgo cardiovascular.

Existen muchas causas de la deficiencia de GH, incluyendo mutaciones de genes específicos, malformaciones congénitas que afectan al hipotálamo y/o la hipófisis, y daño a la hipófisis debido a lesión, cirugía o enfermedad.

- 25 La deficiencia se trata a través de complementación con GH externa. Toda la GH en uso actual es una versión biosintética de GH humana, fabricada mediante tecnología de ADN recombinante. Se usa GH como terapia de sustitución en niños y adultos con deficiencia de GH o bien de inicio en la infancia (tras completarse la fase de crecimiento) o bien de inicio en la edad adulta (habitualmente como resultado de un tumor hipofisario adquirido). En estos pacientes, los beneficios han incluido de manera variable reducción de la masa adiposa, aumento de la masa magra, aumento de la densidad ósea, perfil de lípidos mejorado, reducción de factores de riesgo cardiovascular y bienestar psicosocial mejorado.
- 30

Genentech Inc (EE.UU.) fue el primero en clonar rhGH y se describió esto en la patente EP-B 22242. A partir de 2006, las hormonas de crecimiento sintéticas disponibles en los Estados Unidos y Europa (y sus fabricantes) incluían Nutropin (Genentech), Humatrope (Eli Lilly), Genotropin (Pfizer), Norditropin (Novo Nordisk), Saizen (Merck Serono) y Omnitrope (Sandoz).

- 35 Aunque las técnicas de biología molecular han aumentado espectacularmente la disponibilidad de muchas proteínas y/o polipéptidos (denominados proteínas a continuación en el presente documento), el uso terapéutico de dichas proteínas se ve dificultado a veces por otros factores, tales como corta semivida en plasma debido a aclaramiento renal y mediado por receptor, agregación, degradación proteolítica, escasa biodisponibilidad y propiedades físicas que excluyen las formulaciones eficaces.
- 40 Un mecanismo para una disponibilidad de proteínas aumentada es mediante conjugación de la proteína con compuestos de derivatización, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol y polipropilenglicol. Algunos de estos beneficios reconocidos incluyen: disminución de la inmunogenicidad y antigenicidad, aumento de la duración de acción y propiedades farmacocinéticas alteradas. [Veronese, F.M. "Enzymes for Human Therapy: Surface Structure Modifications," *Chimica Oggi*, 7:53-56 (1989)] (referencia 5 en el presente documento).
- 45 Mediante la pegilación de rhGH, puede ser posible mejorar las características de la molécula para uso médico aumentando su semivida *in vivo* (logrando de ese modo una reducción de la dosificación o reducción de la frecuencia de dosificación), mejorando su estabilidad y disminuyendo su antigenicidad o una combinación de los mismos.

- 50 Generalmente, este tipo de modificación de una molécula se conoce bien en la técnica y existen numerosas patentes disponibles en la bibliografía de patentes, que describen este concepto. Por ejemplo, se describe una

eritropoyetina (EPO) pegilada de Hofmann La Roche en el documento EP-B 1196443 que reivindica un grupo de unión específico que comprende PEG unido covalentemente a EPO, se describe un interferón alfa pegilado en el documento EP-B 975369 de la empresa Nektar/La Roche y otro interferón alfa pegilado en el documento EP-B 1562634 de la empresa Hofmann La Roche.

5 Se cree que el aclaramiento *in vivo* de rhGH se produce mediante los siguientes dos mecanismos. El primero es aclaramiento renal en el que se elimina rhGH de la circulación mediante filtración glomerular renal. El aclaramiento renal de rhGH está bien documentado y la pegilación de rhGH sintética es por tanto una elección obvia para resolver este problema. El aclaramiento renal representa aproximadamente el 25 - 53% del aclaramiento total de rhGH (Girard, J. Mehls, O.J. Clin. Invest. Marzo de 1994; 93(3): 1163-1171, referencia 3 en el presente documento).

10 El segundo mecanismo es el aclaramiento hepático (hígado). La captación hepática de GH se produce mediante endocitosis mediada por receptor seguida por degradación lisosómica.

Un tercer mecanismo es aclaramiento mediado por receptor en otros tejidos tales como condrocitos del cartílago. Reduciendo la afinidad de unión de GH al receptor de GH mediante pegilación, se reducirá el aclaramiento mediado por receptor.

15 Sin embargo, existen problemas dedicados con la administración de rhGH. Una desventaja importante de la rhGH administrada por vía subcutánea es la aparición de lipoatrofia en pacientes que reciben el tratamiento.

La lipoatrofia es el término médico usado para la pérdida localizada de tejido adiposo. Las formulaciones de rhGH administradas por vía subcutánea han presentado problemas de lipoatrofia, que se cree que está provocada por la alta concentración local del complejo de hormona de crecimiento y en el sitio de inyección.

20 Büyükgebiz A. *et al* publicado en J. Pediatr. Endocrinol. Metab. Enero-febrero de 1999; 12(1):95-7 describen un historial médico de este tipo (referencia 1 en el presente documento). Esto es un informe de un paciente con deficiencia de GH aislada debida a una delección génica de 6,7 kb que recibió tratamiento con rhGH a alta dosis y desarrolló lipoatrofias locales en los sitios de inyección sin ninguna detección de anticuerpos después de 6 años de terapia. Se sospecha que la etiología de la lipoatrofia es mediante el efecto lipolítico directo de altas dosis de rhGH.

25 Se cree que la lipoatrofia relacionada con la administración de rhGH está provocada por la propia actividad de rhGH, por mayores concentraciones y por la exposición prolongada. Estas mayores concentraciones se producen cerca de los sitios de las inyecciones.

30 La probabilidad de que se acumule una alta actividad de hormona de crecimiento cerca del sitio de inyección es incluso mayor en caso de que se pegile la rhGH debido a un aumento del tiempo de residencia. En el caso de formulaciones de rhGH pegilada, el tejido experimentará una exposición sostenida y aumentada a la actividad de hormona de crecimiento, debido al hecho de que el conjugado pegilado presenta la actividad necesaria para la actividad farmacológica y el conjugado está limitado por difusión debido al tamaño del conjugado. El desenlace es un aumento de la lipólisis en el sitio de inyección.

35 El documento WO-A 2005/079838 describe hGH pegilada, en la que el resto de hGH se une a un polímero de polietilenglicol mediante un grupo funcional amino, que puede considerarse como una conexión permanente debido a la estabilidad del grupo amino. Un ejemplo de un compuesto de hGH de este tipo, que presenta lipoatrofia, es el compuesto PHA-794428. El compuesto PHA-794428 es una rhGH pegilada y también se describe en el documento WO-A 2005/079838 de la empresa Pharmacia (adquirida por Pfizer) y se describe además en Horm. Res. 2006; 65 (Supl. 4): 1-213, CF1-98 GH/IGF Treatment con el título "First in-human study of PEGylated recombinant human growth hormone", Philip Harris *et al.* (referencia 4 en el presente documento).

40 Según la información del ensayo clínico publicada en www.clinicaltrials.gov, se terminó el ensayo el 10 de diciembre de 2007. La decisión de Pfizer de terminar el programa se debió a casos de lipoatrofia en el sitio de inyección que se notificaron en estudios clínicos de fase 2 después de una única inyección de PHA 794428.

45 El documento WO-A 2006/102659 (Nektar) también describe y sugiere conjugados rhGH-PEG (tipos lineal y ramificado) mediante enlace amida. El problema que ha de resolverse en el documento WO-A 2006/102659 se describe en el párrafo [0005] en la página 2. Según el solicitante, el problema que ha de resolverse es la reducción de la frecuencia de dosificación. Puesto que la terapia con rhGH requiere normalmente inyecciones diarias, a los pacientes, y en particular, a los pacientes pediátricos, no les gustan las incomodidades y molestias asociadas con este régimen. La solución descrita en el documento WO-A de Nektar es la provisión de nuevos conjugados PEG-rhGH.

50 En tabla 6, párrafo [0257] del documento WO-A puede observarse que los conjugados PEG-rhGH tienen una actividad relativamente baja *in vitro* en comparación con la hormona de crecimiento nativa sin PEG. A pesar de las

bajas actividades *in vitro*, los conjugados de rhGH pegilada eran activos *in vivo*. En relación con esto léase la sección: "Aunque los resultados preliminares *in vitro* sugieren que el aumento de la cantidad de PEG unido a hGH reduce su capacidad para estimular el receptor de hGH, basándose en los resultados preliminares *in vivo*, parece que una reducción de la bioactividad se ve más que equilibrada por un aumento de la semivida y/o disponibilidad en plasma, conduciendo por tanto a una conclusión de que los conjugados proporcionados en el presente documento presentan un efecto farmacodinámico superior *in vivo* en comparación con rhGH sin modificar en un régimen de dosificación idéntico".

El documento WO-A 2006/102659 (Nektar) no describe grupos de unión autoescindibles, es decir se observa simplemente que los conjugados PEG-rhGH son activos *in vivo* aunque sus actividades *in vitro* se reducen significativamente. No se aborda el problema de la lipoatrofia.

Una solución al reto de modificar por ingeniería las propiedades deseadas de lipoatrofia reducida y frecuencia de inyección reducida en un conjugado pegilado de hGH es el uso de un enfoque de profármaco. Un profármaco es cualquier compuesto que experimenta biotransformación antes de presentar sus efectos farmacológicos. Los profármacos pueden considerarse por tanto fármacos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados usados de manera transitoria para alterar o para eliminar propiedades no deseadas en la molécula original. En este caso, un portador polimérico reduciría de manera transitoria la actividad de hormona de crecimiento y, por consiguiente, reduciría la probabilidad de lipólisis del tejido. La conjugación transitoria con un portador polimérico ampliaría al mismo tiempo la semivida del conjugado y por tanto proporcionaría una administración de acción prolongada de hGH.

Se describen numerosos profármacos macromoleculares en la bibliografía en los que el portador macromolecular se une mediante un grupo éster lábil al agente farmacéutico (por ejemplo Y. Luo, MR Ziebell, GD Prestwich, "A Hyaluronic Acid - Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells", *Biomacromolecules* 2000, 1, 208-218, J Cheng *et al*, *Synthesis of Linear, beta-Cyclodextrin Based Polymers and Their Camptothecin Conjugates*, *Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 1007-1017, R. Bhatt *et al*, *Synthesis and in Vivo Antitumor Activity of Poly(L-glutamic acid) Conjugates of 20(S)-Camptothecin*, *J. Med. Chem.* 2003, 46, 190-193; R.B. Greenwald, A. Pendri, C.D. Conover, H. Zhao, Y.H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Guan, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3657-3667; B. Testa, J.M. Mayer en *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, 2003, capítulo 8) En estos casos, el grupo funcional conjugado de la entidad bioactiva es un grupo hidroxilo o un ácido carboxílico.

Especialmente para biomacromoléculas pero también para profármacos de polímero de molécula pequeña, puede ser deseable unir el portador macromolecular a grupos amino (es decir extremo grupos amino de lisina o N-terminal de proteínas) de la entidad bioactiva. Esto será el caso si el enmascaramiento de la bioactividad del fármaco requiere conjugación de un determinado grupo amino de la entidad bioactiva, por ejemplo un grupo amino ubicado en un centro activo o una región o epítipo implicado en la unión al receptor. Además, durante la preparación del profármaco, pueden direccionarse grupos amino de manera más quimioselectiva y servir para controlar mejor la conjugación de portador y fármaco debido a su mayor nucleofilicidad en comparación con grupos hidroxílicos o fenólicos. Esto es particularmente cierto para proteínas que pueden contener una gran variedad de diferentes funcionalidades reactivas. En este caso, reacciones de conjugación no selectivas conducen a mezclas de productos no deseadas que requieren una extensa caracterización o purificación y pueden disminuir el rendimiento de reacción y la eficacia terapéutica del producto.

Puede producirse la activación del profármaco mediante escisión enzimática o no enzimática del puente lábil entre el portador y la molécula de fármaco, o una combinación secuencial de ambos, es decir una etapa enzimática seguida por una transposición no enzimática.

En el documento WO-A 2005/099768 se describen moléculas de grupo de unión pegiladas con grupos de unión autoescindibles para un gran grupo de biomoléculas incluyendo somatropinas (reivindicación 6). En el documento WO-A 2005/099768, el problema que ha de resolverse es la variabilidad entre pacientes y un efecto impredecible de la activación del profármaco cuando está implicado un mecanismo enzimático (página 12, línea 17-30). Esta solicitud describe como solución un grupo de unión aromático, que puede basarse en PEG. Este grupo de unión-PEG se une al fármaco de manera que se reduce significativamente la actividad del fármaco. Se activa sólo con la liberación del fármaco, que se inicia mediante hidrólisis. La velocidad de hidrólisis puede controlarse químicamente. No se da un énfasis especial a GH y problemas relevantes, como la lipoatrofia, en relación con esto como tal.

En resumen, ninguna de las citas mencionadas anteriormente describe una solución para desarrollar una rhGH de acción prolongada, basándose en un conjugado de profármaco que puede administrarse con menos frecuencia sin aumentar la frecuencia de lipoatrofia.

Por tanto, es un objeto de la presente invención la provisión de un profármaco de este tipo o una composición farmacéutica que comprende dicho profármaco para reducir la frecuencia de administración de rhGH usando PEG conjugado con rhGH sin inducir significativamente lipoatrofia.

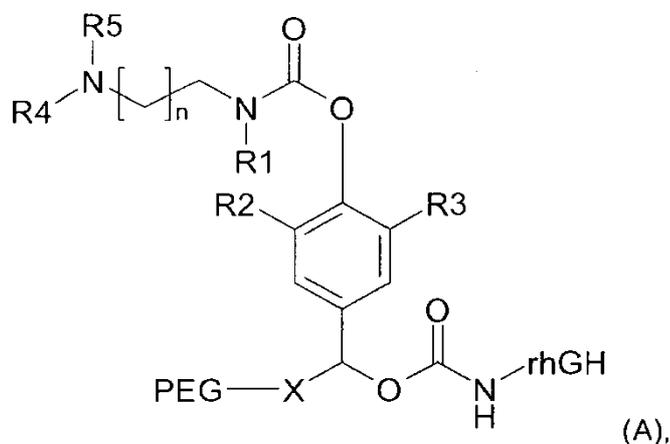
Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende excipientes farmacéuticos adecuados y que comprende también una cantidad eficaz clínica *in vivo* en seres humanos de un conjugado de profármaco pegilado de una hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH), en la que PEG se une a rhGH mediante un grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescindible); estando dicho conjugado de profármaco caracterizado porque:

(1): el conjugado tiene una actividad GH que es menor del 5% de la hormona de crecimiento nativa sin PEG; y

(2): la velocidad de autohidrólisis de grupo de unión es tal que la semivida *in vivo* es de desde 10 horas hasta 600 horas que se mide mediante inyección intravenosa en ratas del conjugado, seguido por la extracción de muestras de sangre a intervalos de tiempo, preparación de plasma y análisis de hGH usando ELISA; y

en la que el conjugado de profármaco pegilado tiene la estructura química (A):



en la que HN-rhGH representa el residuo de rhGH unido al grupo de unión transitorio;

R1, R2, R3, R4 y R5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo;

PEG representa el residuo de pegilación unido al grupo de unión transitorio;

n = 1 ó 2; y

X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12; y

en la que el PEG es ramificado y contiene al menos 3 cadenas.

La propiedad (1) garantiza que el profármaco tiene una baja incidencia de lipoatrofia a pesar de tener una duración de acción significativamente ampliada *in vivo*. Sin limitarse por la teoría, los presentes inventores creen que si el profármaco tuviera una mayor actividad GH, este producto todavía induciría lipoatrofia a una mayor frecuencia que los productos de rhGH comercializados actualmente.

La propiedad (2) garantiza que rhGH (sin PEG) se libera gradualmente a lo largo del tiempo de modo que puede administrarse el producto farmacéutico de rhGH con menos frecuencia que la hormona de crecimiento humana, por ejemplo sólo una vez a la semana o una vez al mes en vez de administraciones diarias, mientras que todavía conserva una eficacia total en comparación con rhGH.

Preferiblemente, la semivida *in vivo* es hasta 5 veces más corta, por ejemplo 2, 3, 4 ó 5 veces más corta, que la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente. Más preferiblemente, la semivida *in vivo* es hasta 3 veces más corta que la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente. Lo más preferiblemente, la semivida *in vivo* es hasta 2 veces más corta que o casi idéntica a la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente.

Esta invención se aplica a profármacos pegilados de rhGH, en particular a profármacos portadores pegilados de

rhGH incluyendo profármacos portadores en cascada.

Los profármacos pueden definirse como agentes terapéuticos que son inactivos *per se* pero que se transforman de manera predecible en metabolitos activos (véase B. Testa, J.M: Mayer en *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, 2003, página 4). En sistemas de profármacos portadores, muchos agentes farmacéuticos son inactivos o muestran disminución de la actividad biológica cuando se conjuga covalentemente un polímero con la molécula de fármaco. En estos casos, se aplica una unión transitoria de fármaco y portador de tal modo que el agente farmacéutico se libera del portador polimérico *in vivo* para volver a adquirir su actividad biológica. La actividad biológica reducida del profármaco en comparación con el fármaco liberado es ventajosa si se desea una liberación lenta o controlada del fármaco. En este caso, puede administrarse una cantidad relativamente grande de profármaco sin efectos secundarios concomitantes ni el riesgo de sobredosis. La liberación del fármaco se produce a lo largo del tiempo, reduciendo de ese modo la necesidad de administración repetida y frecuente del fármaco.

En profármacos portadores poliméricos, se unen a menudo restos biológicamente activos a un resto portador polimérico mediante un puente lábil formado entre el resto portador y un grupo funcional de la molécula de fármaco. La escisión de un profármaco portador genera una entidad molecular (fármaco) de bioactividad aumentada y al menos un producto secundario, el portador. Este producto secundario puede ser biológicamente inerte (por ejemplo PEG). Después de la escisión, la entidad bioactiva revelará al menos un grupo funcional previamente conjugado y de ese modo enmascarado o protegido, y la presencia de este grupo contribuye normalmente a la bioactividad. Puede medirse la actividad GH usando métodos conocidos en la técnica. A este respecto, se pone énfasis en el ejemplo 1. Basándose en el hecho de que algunos grupos de unión transitorios aplicables para la presente invención pueden tener una semivida *in vitro* de menor de 3000 h, se realiza la medición de actividad GH respectiva indirectamente determinando la actividad GH de un conjugado de PEG respectivo que comprende un grupo de unión permanente en vez del grupo de unión transitorio. Esto puede llevarse a cabo tal como se describe en el documento WO2006102659 en la página 74, párrafo 0240, se evaluarán *in vitro* la actividad biológica de rhGH y los conjugados descritos en el presente documento usando un ensayo de proliferación de células de linfoma de rata NB2-II. En resumen, se incuban con rhGH células NB2-II derivadas de un linfoma de rata, lo que conduce a la unión de la molécula de rhGH a su receptor en la superficie celular. La unión al receptor induce la cascada de transducción de señales, que da como resultado la proliferación de las células. Los resultados del ensayo se basan en el contenido de proteína determinado y una bioactividad del 100% de rhGH sin modificar.

Preferiblemente, para la medición de la actividad GH se usa el protocolo descrito en el ejemplo 24.

Puede medirse la semivida *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica. A este respecto, se pone énfasis en el ejemplo 2.

Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a una cantidad eficaz clínica de la composición farmacéutica que comprende el profármaco pegilado de rhGH del primer aspecto para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad relacionada con GH en una persona.

Este segundo aspecto puede formularse alternativamente como método para el tratamiento de una enfermedad relacionada con GH en una persona que comprende administrar a una persona una cantidad eficaz clínica de la composición farmacéutica que comprende el profármaco pegilado de rhGH del primer aspecto.

En una situación en la que se reduce significativamente la actividad residual del profármaco (como es el caso para rhGH conjugada con PEG de manera transitoria) en comparación con GH humana nativa, pueden no producirse efectos lipolíticos ni siquiera en la exposición prolongada.

Los compuestos descritos en el presente documento denominados profármacos pegilados de rhGH son conjugados que pueden tener una actividad residual significativamente reducida en comparación con GH humana. Para presentar actividad terapéuticamente útil, rhGH tiene que liberarse del conjugado de profármaco, para lo que los profármacos descritos en el presente documento necesitan someterse a una etapa de activación (por ejemplo, mecanismos de liberación 1,6), denominada autoescisión en el presente documento, que escinde el grupo PEG del fármaco. El mecanismo de liberación 1,6 se describe bien en el documento WO-A 2005/099768.

Sin limitarse por la teoría, los presentes inventores creen que los conjugados de rhGH pegilada de manera transitoria dados a conocer en el presente documento reducen significativamente la lipoatrofia debido a la baja actividad de los conjugados de rhGH pegilada, antes de que se retire gradualmente el PEG por escisión mediante el grupo de unión autoescindible. Esto puede garantizar que los profármacos no inducirán lipoatrofia con más frecuencia que GH humana u otros compuestos de rhGH pegilada de manera permanente tal como se describió anteriormente.

Aún otro aspecto de la presente invención es un conjugado de profármaco tal como se definió anteriormente.

Se describen a continuación realizaciones preferidas de la presente invención, a modo de ejemplos únicamente.

Definiciones

Antes de un análisis de las realizaciones detalladas de la invención se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

- 5 En general, todos los términos técnicos específicos usados en el presente documento se entenderán como los entendería un experto en el presente contexto técnico.

rhGH o hGH o GH o residuo de hGH se refiere una hormona de crecimiento humana. NH-hGH es un residuo de hGH, en el que -NH- de -NH-hGH representa un grupo amino de hGH.

- 10 El término "actividad" se entiende en el presente documento como la capacidad de la hormona de crecimiento o un conjugado de la misma, para evocar una respuesta biológica cuando se administra a un mamífero, por ejemplo en un modelo *in vivo*, o para producir una respuesta medible en un modelo *in vitro* tal como se describe en los ejemplos.

- 15 En un sistema de profármaco, la actividad medida tendrá dos contribuciones, una de la entidad de fármaco libre liberada y otra del conjugado de profármaco no escindido aún. Para diferenciar la actividad del conjugado de profármaco, el término "actividad residual" se entiende en el presente documento como la parte de la actividad de profármaco medida que puede atribuirse al conjugado de profármaco.

- 20 El término "autoescisión" se entiende en el presente documento como escisión hidrolítica limitante de la velocidad del enlace entre el grupo de unión transitorio y la molécula de fármaco rhGH en una disolución acuosa tamponada en condiciones fisiológicas de pH 7,4 y 37°C. La autoescisión no requiere la presencia de enzima. Esta autoescisión o autohidrólisis se controla mediante un grupo de inducción de autoescisión, que forma parte de la molécula de profármaco. Este grupo de inducción de autoescisión puede estar presente tal cual o en una forma enmascarada de modo que se requiere desenmascaramiento antes de que pueda iniciarse el mecanismo de autohidrólisis.

- 25 La velocidad de autohidrólisis de grupo de unión se refiere a la velocidad de escisión de un profármaco pegilado de hGH *in vivo*. Como los efectos enzimáticos u otros provocan casi siempre que la hidrólisis del grupo de unión de profármaco avance más rápido *in vivo* que *in vitro*, se define que un profármaco de hGH-PEG se escinde de modo autohidrolítico si la semivida *in vivo* del profármaco es hasta 5 veces más corta que la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente.

- 30 El término "unión transitoria" o "grupo de unión transitorio" se entiende en el presente documento como que describe la labilidad de la unión entre PEG y rhGH en un profármaco pegilado de rhGH. En tales uniones transitorias, rhGH se libera del profármaco correspondiente con una semivida *in vivo* de grupo de unión de hasta 1200 horas.

El término "conjugado" se entiende en el presente documento como una o más moléculas de PEG unidas covalentemente al fármaco que es en el presente documento la hormona de crecimiento humana.

El término "transitorio conjugado" se refiere a profármacos pegilados de hGH que contienen al menos una unión transitoria.

- 35 El término "conjugado permanente" se refiere a conjugados pegilados de hGH o los profármacos en los que el polímero de PEG se conecta a hGH por medio de uniones con una semivida *in vitro* de al menos 3000 horas. La semivida *in vitro* o semivida *in vitro* de grupo de unión es la liberación del 50% de hGH del profármaco pegilado de hGH en tampón a pH 7,4 y 37°C.

- 40 Los términos "semivida *in vivo*" o "semivida *in vitro* de grupo de unión" se entienden como el intervalo de tiempo en el que se libera el 50% de la proporción inicial de la hormona de crecimiento del profármaco pegilado de hGH después de la administración al cuerpo humano, calculado teniendo en cuenta la semivida del conjugado correspondiente del compuesto tal como se describe en el ejemplo 2.

El término "semivida del conjugado" se entiende como el intervalo de tiempo en el que se elimina el 50% de un conjugado permanente pegilado de hGH tal como se definió anteriormente de la circulación sanguínea.

- 45 El término "lipoatrofia" se entiende en el presente documento como un término médico para la pérdida localizada de tejido adiposo. En el presente contexto "lipoatrofia" se refiere a lipoatrofia en el sitio de inyección que significa que se produce lipólisis de tejido en estrecha proximidad del sitio de inyección.

El término “profármaco” se entiende en el presente documento que es cualquier compuesto que experimenta transformación antes de presentar sus efectos farmacológicos completos. Se facilita la clasificación de los sistemas de profármaco según las definiciones de la IUPAC (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem>, al que se accedió el 8 de marzo 2004):

5 Profármaco

Un profármaco es cualquier compuesto que experimenta biotransformación antes de presentar sus efectos farmacológicos. Los profármacos pueden considerarse por tanto fármacos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados usados de manera transitoria para alterar o para eliminar propiedades no deseadas en la molécula original.

10 Doble profármaco (o pro-profármaco)

Un doble profármaco es una molécula biológicamente inactiva que se transforma *in vivo* en dos etapas (enzimática y/o químicamente) en la especie activa.

Profármaco unido a portador (Profármaco portador)

15 Un profármaco unido a portador es un profármaco que contiene una unión temporal de un principio activo dado con un grupo portador transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que puede retirarse fácilmente *in vivo*, habitualmente mediante una escisión hidrolítica.

Profármaco en cascada

Un profármaco en cascada es un profármaco para el que la escisión del grupo portador sólo se vuelve eficaz después de desenmascarar un grupo activante.

20 Biotransformación

Biotransformación es la conversión química de sustancias por organismos vivos o preparaciones de enzimas.

25 De manera correspondiente, un grupo de inducción de autohidrólisis en cascada sólo se vuelve eficaz después del desenmascaramiento de terminados elementos estructurales de inducción de autohidrólisis. Pueden requerirse una o más etapas de desenmascaramiento en cascada para revelar los elementos estructurales de inducción de autohidrólisis. Al menos una de las etapas de desenmascaramiento puede basarse en una etapa de biotransformación.

30 El término “una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz clínica *in vivo* en seres humanos de un profármaco pegilado de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH)” ha de entenderse como una cantidad que es suficientemente alta como para obtener un efecto clínico deseado en un ser humano después de la administración de la composición farmacéutica al ser humano, por ejemplo un efecto clínico deseado en relación con el tratamiento de una enfermedad relacionada con GH. En el presente contexto, el experto puede ajustar de manera rutinaria la cantidad de profármaco pegilado de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) que ha de administrarse para obtener un efecto clínico deseado.

35 El término “condiciones fisiológicas” se entiende en el presente documento como cualesquiera condiciones *in vitro* o *in vivo*, idéntica o que se asemeje a, las condiciones de pH y temperatura en el cuerpo humano. Más específicamente condiciones fisiológicas se refiere a condiciones a aproximadamente pH 7,4 (de pH 6,8 a pH 7,8) y aproximadamente 37°C (de 35°C a 40°C).

40 El término “grupo de unión” se usa frecuentemente en publicaciones en el campo de la bioconjugación y describe ampliamente estructuras químicas usadas para conectar dos entidades moleculares. Tal conectividad puede ser de naturaleza permanente o transitoria.

45 Un grupo de unión transitorio es un grupo de unión en el que la conjugación de fármaco con molécula de PEG es reversible. Esto implica que la escisión del grupo de unión libera el fármaco en su forma nativa y activa. Puede ser difícil diferenciar estructuralmente una unidad de grupo de unión transitorio del polímero portador en el caso de profármacos portadores, particularmente si el polímero se une de manera permanente al grupo de unión y por tanto no se libera el producto de degradación relacionado con el grupo de unión como consecuencia de la escisión del profármaco.

El término “grupo de unión permanente” se refiere a un conjugado de PEG con un grupo amino primario donado por

5 hGH mediante la formación de una amida alifática o un carbamato alifático. Si se usan reactivos de pegilación convencionales, los conjugados resultantes son habitualmente muy estables frente a la hidrólisis y la velocidad de escisión del enlace amida o carbamato sería demasiado lenta para tener utilidad terapéutica en un sistema de profármaco. No obstante, tales conjugados de grupo de unión permanente son útiles para la investigación de la utilidad terapéutica de un conjugado de profármaco ya que permite la evaluación de la actividad residual.

Si van a emplearse tales uniones estables en un enfoque de profármaco, no es posible la escisión del grupo funcional en un intervalo de tiempo terapéuticamente útil sin catálisis enzimática.

10 El término "profármaco soluble en agua" significa un profármaco que es soluble en agua en condiciones fisiológicas. Normalmente, un profármaco soluble en agua transmitirá al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 95%, de la luz transmitida por la misma disolución después de filtración. En una base en peso, un polímero soluble en agua será preferiblemente soluble en agua en al menos aproximadamente el 35% (en peso), todavía más preferiblemente en al menos aproximadamente el 50% (en peso), todavía más preferiblemente en al menos aproximadamente el 70% (en peso), todavía más preferiblemente en al menos aproximadamente el 85% (en peso), todavía más preferiblemente en al menos aproximadamente el 95% (en peso) o completamente soluble en agua.

15 El término "PEG" o "residuo de pegilación" se usa en el presente documento a modo de ejemplo para polímeros solubles en agua adecuados caracterizados por unidades de repetición. Pueden seleccionarse polímeros adecuados del grupo que consiste en polímeros de polialquiloilo, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(alcoholes vinílicos), polioxazolin, polianhídridos, polioctoésteres, policarbonatos, poliuretanos, poli(ácidos acrílicos), poliacrilamidas, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliorganofosfacenos, polisiloxanos, polivinilpirrolidona, policianoacrilatos y poliésteres.

Las cadenas de PEG pueden consistir en un resto de interconexión, un resto de polímero y un grupo terminal.

El término "carga de PEG" se entiende en el presente documento como un descriptor de la masa molecular de una cadena de polímero que consiste en varias unidades de repetición unidas a hGH. La carga de PEG total se entiende como la masa molecular total de todas las cadenas de portador polimérico unidas a hGH en una base molecular.

25 Descripción detallada de la invención

Composición farmacéutica que comprende excipientes farmacéuticos adecuados

Tal como conoce el experto una composición farmacéutica comprende excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.

30 "Farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier excipiente y/o aditivo, que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que, no es tóxico para el huésped al que se administra.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es una composición para administración subcutánea, administración intramuscular o inyección intravenosa. Esto son ejemplos de vías de administración preferidas para el tratamiento de un trastorno/enfermedad relevante tal como se describe en el presente documento.

35 La composición farmacéutica puede comprender otros principios activos distintos de un profármaco pegilado de rhGH tal como se describe en el presente documento.

Hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH)

40 Puesto que la GH humana recombinante es de secuencia idéntica a la GH humana natural, el término hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) también se refiere en el presente documento a los denominados equivalentes biogénicos. Por tanto, los términos rhGH y hGH pueden usarse de manera sinónima dentro del significado de la presente invención.

45 El término "productos biogénicos" se entiende en el presente documento como formas genéricas de productos biofarmacéuticos; moléculas desarrolladas usando procesos biológicos, habitualmente a través de actividad de biotecnología moderna. Los productos farmacéuticos químicos genéricos pueden definirse como aquellas moléculas que, en comparación con el producto original: tienen esencialmente actividad similar, son esencialmente idénticas químicamente a sus homólogos de marca, son bioequivalentes, consiguen la autorización de comercialización a través de un procedimiento abreviado tras el vencimiento de la patente.

Tal como conoce el experto, hoy en día es trabajo de rutina realizar, por ejemplo, cambios de amino menores de un producto biológico de interés (GH en el presente documento) sin afectar significativamente la actividad del producto

biológico.

Además de productos biogénicos y humanos recombinantes, el término hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) también se refiere en el presente documento a todos los posibles polipéptidos de rhGH.

5 Se facilita una descripción precisa de posibles polipéptidos de rhGH en el documento WO-A 2005/079838 de Pharmacia Corporation proporcionada en la página 15, párrafo 0043 hasta e inclusive el párrafo 0053.

10 El término "polipéptido de hGH o proteína hGH", cuando se usa en el presente documento, engloba todos los polipéptidos de hGH, preferiblemente de especies de mamíferos, más preferiblemente de especies murinas y de ser humano, así como sus variantes, análogos, ortólogos, homólogos, y derivados, y fragmentos de los mismos que se caracterizan por fomentar el crecimiento en la fase de crecimiento y por mantener la composición, el anabolismo y el metabolismo de lípidos corporales normales.

15 El término "polipéptido de hGH o proteína hGH" se refiere preferiblemente al polipéptido de hGH de 22 kDa que tiene una secuencia dada a conocer en A.L. Grigorian *et al.*, Protein Science (2005), 14, 902-913 así como sus variantes, homólogos y derivados que presentan esencialmente la misma actividad biológica (fomentar el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición, el anabolismo y el metabolismo de lípidos corporales normales). Más preferiblemente, el término "polipéptido de hGH o proteína hGH" se refiere al polipéptido que tiene exactamente la secuencia mencionada anteriormente.

20 Los derivados de hGH engloban especialmente conjugados de profármaco de hGH que comprenden polímeros unidos de manera permanente, como PEG, es decir el profármaco de la presente invención puede comprender, además de uno o más conjugados de polímero de grupo de unión transitorio, conjugados de polímero de grupo de unión permanente adicionales.

25 El término "variantes de polipéptido de hGH", tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos de la misma especie pero que difieren de un polipéptido de hGH de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias de aminoácidos de la referencia y la variante son estrechamente similares de manera global y, en muchas regiones, idénticas. Preferiblemente, los polipéptidos de hGH son idénticos en al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a un polipéptido de hGH de referencia, preferiblemente el polipéptido de hGH que tiene una secuencia tal como se indica en A.L. Grigorian *et al.*, Protein Science (2005), 14, 902-913. Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, "idéntica" en el 95% a una secuencia de aminoácidos de consulta, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia de consulta excepto porque la secuencia de polipéptido objeto puede incluir alteraciones de hasta cinco aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en posiciones amino o carboxilo-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. La secuencia de consulta puede ser toda una secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia o cualquier fragmento especificado tal como se describe en el presente documento.

40 Tales variantes de polipéptido de hGH pueden ser variantes que se producen de manera natural, tales como variantes alélicas que se producen de manera natural codificadas por una de varias formas alternas de una hGH que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo, o isoformas codificadas por variantes de corte y empalme que se producen de manera natural que se originan a partir de un solo transcrito primario. Alternativamente, una variante de polipéptido de hGH puede ser una variante que no se sabe que se produce de manera natural y puede prepararse técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Se sabe en la técnica que uno o más aminoácidos pueden delecionarse del extremo N-terminal o extremo C-terminal de una proteína o un péptido bioactivo sin pérdida sustancial de función biológica (véase por ejemplo, Ron *et al.*, (1993), Biol Chem., 268 2984-2988).

45 También se reconocerá por un experto habitual en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos de polipéptidos de hGH pueden variarse sin un efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Tales mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas según reglas generales conocidas en la técnica de modo que tengan poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, se proporciona orientación sobre cómo producir sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie *et al.* (1990), Science 247:1306-1310, en el que los autores indican que existen dos enfoques principales para estudiar la tolerancia al cambio de una secuencia de aminoácidos.

55 El primer método se basa en el proceso de evolución, en el que las mutaciones o bien se aceptan o bien se rechazan mediante selección natural. El segundo enfoque usa la ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de una hGH clonada y selecciones o exámenes para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además que es probable que los cambios de aminoácidos

sean permisivos en una determinada posición de la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácido más profundos requieren cadenas laterales apolares, mientras que generalmente se conservan pocas características de cadenas laterales de superficie. Se describen otras de tales sustituciones fenotípicamente silenciosas en Bowie *et al.*, (1990) citado anteriormente, y las referencias citadas en ese documento.

5 Normalmente se consideran sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Phe, el intercambio de los residuos con hidroxilo Ser y Thr, el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos con amida Asn y Gln, el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y reemplazos entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Además, los siguientes grupos de aminoácidos representan generalmente cambios equivalentes: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; (5) Phe, Tyr, Trp, His.

15 El término polipéptido de hGH también engloba todos los polipéptidos de hGH codificados por análogos, ortólogos y/o homólogos de especies de hGH. Tal como se usa en el presente documento, el término "análogos de hGH" se refiere a hGH de organismos diferentes y no relacionados que realizan las mismas funciones en cada organismo pero que no se originaron a partir de una estructura ancestral que tuvieran en común los ancestros de los organismos. En su lugar, las hGH análogas surgieron por separado y después evolucionaron para realizar la misma función (o funciones similares). En otras palabras, los polipéptidos de hGH análogos son polipéptidos con secuencias de aminoácidos bastante diferentes pero que realizan la misma actividad biológica, concretamente fomentar el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición, el anabolismo y el metabolismo de lípidos corporales normales. Tal como se usa en el presente documento, el término "ortólogos de hGH" se refiere a hGH dentro de dos especies diferentes cuyas secuencias están relacionadas entre sí mediante una hGH homóloga en una especie ancestral pero que han evolucionado para volverse diferentes entre sí. Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogos de hGH" se refiere a hGH de diferentes organismos que realizan las mismas funciones en cada organismo y que se originan a partir de una estructura ancestral que tenían en común los ancestros de los organismos. En otras palabras, los polipéptidos de hGH homólogos son polipéptidos con secuencias de aminoácidos bastante similares que realizan la misma actividad biológica, concretamente fomentar el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición, el anabolismo y el metabolismo de lípidos corporales normales. Preferiblemente, los homólogos de polipéptido de hGH pueden definirse como polipéptidos que presentan una identidad de al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con un polipéptido de hGH de referencia, preferiblemente el polipéptido de hGH que tiene una secuencia tal como se mencionó anteriormente.

Por tanto, un polipéptido de hGH puede ser, por ejemplo: (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácido se sustituyen por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético: o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácido incluyen un grupo sustituyente: o (iii) uno en el que el polipéptido de hGH se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol): o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan a la forma anterior del polipéptido, tal como una secuencia secretora o líder o péptido de región de fusión IgG-Fc o una secuencia que se emplea para la purificación de la forma anterior del polipéptido o una secuencia de pro-proteína. Los polipéptidos de hGH puede ser monómeros o multímeros. Los multímeros puede ser dímeros, trímeros, tetrámeros o multímeros que comprenden al menos cinco unidades monoméricas de polipéptido. Los multímeros también pueden ser homodímeros o heterodímeros. Los multímeros pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden unirse indirectamente, por ejemplo, mediante la formación de liposomas. En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre las secuencias heterólogas contenidas en una proteína de fusión que contiene un polipéptido de hGH o fragmento del mismo (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.478.925). En otro ejemplo, un polipéptido de hGH o fragmento del mismo se une a uno o más polipéptidos que pueden ser o bien polipéptidos de hGH o bien polipéptidos heterólogos a través de grupos de unión peptídicos tales como los descritos en el documento US 5.073.627.

Otro método para preparar polipéptidos de hGH multímeros implica el uso de polipéptidos de hGH fusionados a una secuencia de polipéptido de cremallera de leucina o cremallera de isoleucina que se sabe que fomenta la multimerización de las proteínas en las que se encuentran usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica incluyendo las enseñanzas del documento WO 94/10308. En otro ejemplo, pueden asociarse polipéptidos de hGH mediante interacciones entre la secuencia de polipéptido Flag® contenida en polipéptidos de hGH de fusión que contienen la secuencia de polipéptido Flag®. También pueden generarse multímeros de hGH usando técnicas químicas conocidas en la técnica tal como reticulación usando moléculas de grupo de unión y técnicas de optimización de la longitud de moléculas de grupo de unión conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.478.925), técnicas conocidas en la técnica para formar una o más reticulaciones intermoleculares entre los residuos de cisteína ubicados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, el documento US 5.478.925, adición de cisteína o biotina al extremo C-terminal o extremo N-terminal del polipéptido de hGH y técnicas para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, el documento US 5.478.925), o cualquiera de las 30 técnicas para generar liposomas que contienen multímeros de hGH (véase, por ejemplo, la patente estadounidense

número 5.478.925).

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento de polipéptido de hGH" se refiere a cualquier péptido o polipéptido que comprende un tramo contiguo de una parte de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de hGH, preferiblemente el polipéptido que tiene la secuencia mencionada anteriormente.

5 Cadenas de polímero de profármaco pegilado de rhGH - PEG preferido

Tal como se analizó anteriormente, el profármaco pegilado de rhGH tal como se describe en el presente documento tendrá una actividad relativamente baja.

10 Por consiguiente, en una realización preferida la carga de PEG total por molécula de hormona de crecimiento asciende a al menos 25 kDa. Generalmente la carga de PEG total será menor de 1000 kDa. Preferiblemente, la carga de PEG es de al menos 25 kDa y como máximo de 500 kDa, incluso más preferiblemente de al menos 30 kDa y como máximo de 250 kDa, incluso más preferiblemente de al menos 30 kDa y como máximo de 120 kDa, incluso más preferiblemente de al menos 40 kDa y como máximo de 100 kDa, incluso más preferiblemente de al menos 40 kDa y como máximo de 90 kDa.

15 PEG puede unirse a hGH a través de uno o más puntos de anclaje. En caso de un punto de anclaje, el PEG correspondiente en el monoconjugado de profármaco de hGH-PEG será ramificado y contendrá al menos 3 cadenas.

20 Un PEG ramificado es una molécula de PEG que consiste en un punto de ramificación que conecta dos o más cadenas de PEG, para formar una molécula con un punto de anclaje para la unión a la hormona de crecimiento. Esto podrán ser dos cadenas de PEG de 20 kDa unidas para formar una molécula de PEG de 40 kDa ramificado. En el caso en el que la molécula contiene dos o tres puntos de ramificación, la molécula se denomina PEG con 3 y 4 brazos, respectivamente.

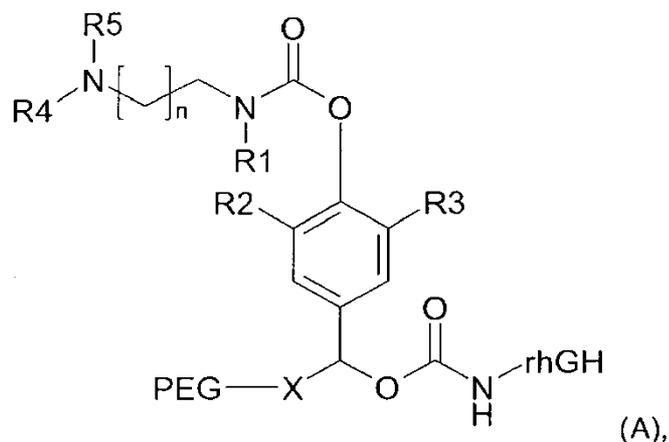
En resumen y dentro de las restricciones mencionadas anteriormente, el polímero de PEG no se limita a una estructura particular y puede ser ramificado, o de múltiples brazos (por ejemplo PEG en horquilla o PEG unido a un poliol de núcleo), dendrítico o con grupos de unión degradables.

25 Sin limitarse a la teoría, se pretende que la carga de PEG proporcione una masa molecular adecuada para obtener la actividad relativamente baja requerida y no tener una masa molecular demasiado alta del PEG que crearía otros problemas.

30 La pegilación con GH humana nativa puede producirse en varios grupos lisina o en la amina N-terminal (F1) tal como se describe bien por Clark *et al.* (referencia 2 en el presente documento) en la página 21973, tabla III. Son altamente reactivas las posiciones F1 y LYS-140. Son posiciones moderadamente reactivas LYS-115, LYS-38 y LYS-70. Son escasamente reactivas las posiciones LYS-172, LYS-41, LYS-158 y LYS-168.

35 En términos más generales, el PEG usado en el presente documento en combinación con un grupo de unión transitorio puede reducir el riesgo de lipoatrofia mediante la elección adecuada de dicho polímero. Sin embargo, los principios de la presente invención también se aplican a polímeros distintos de PEG. Por tanto, el término PEG sólo se usa en el presente documento a modo de ejemplo para polímeros adecuados.

El conjugado de profármaco pegilado comprendido en la composición farmacéutica tiene la estructura química (A):



en la que

NH-rhGH representa el residuo de rhGH unido al grupo de unión transitorio;

5 R1, R2, R3, R4, y R5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo,

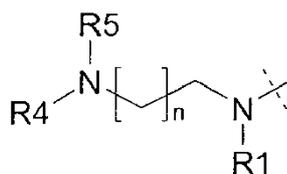
PEG representa el residuo de pegilación unido al grupo de unión transitorio, y

$n = 1$ ó 2 , y

X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12.

10 El término "heteroalquilo C1 a C12" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono que están interrumpidos opcionalmente por heteroátomos, grupos funcionales, carbociclos o heterociclos tal como se definió anteriormente.

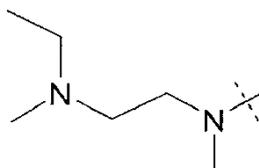
Se proporcionan estructuras más preferidas estructuras mediante la fórmula general I, que forman parte de la estructura (A) dentro de la estructura de grupo de unión aromática general anterior:

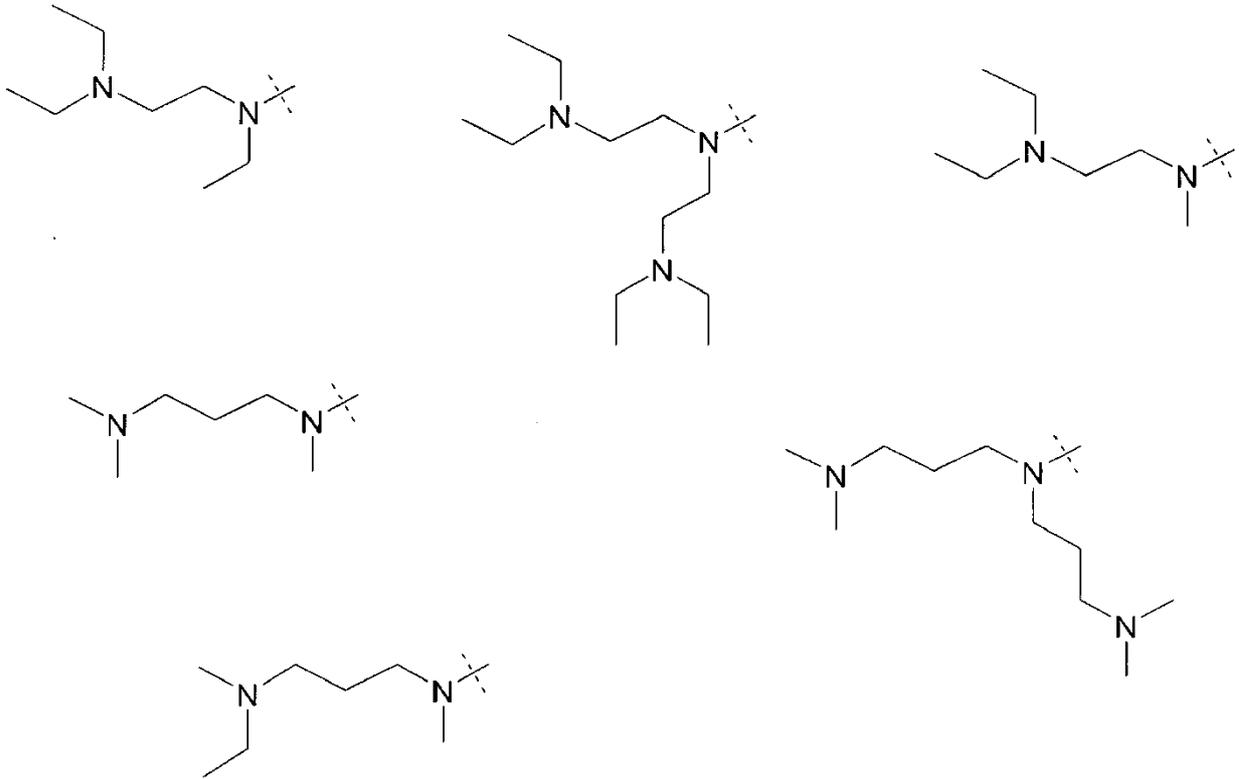


15

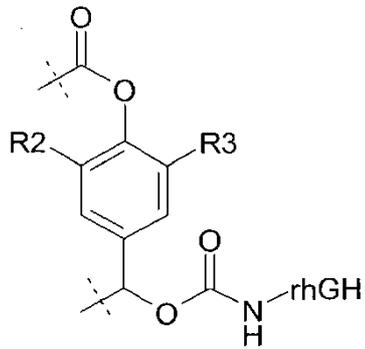
Fórmula I

y en la que los ejemplos preferidos de fórmula I comprenden:





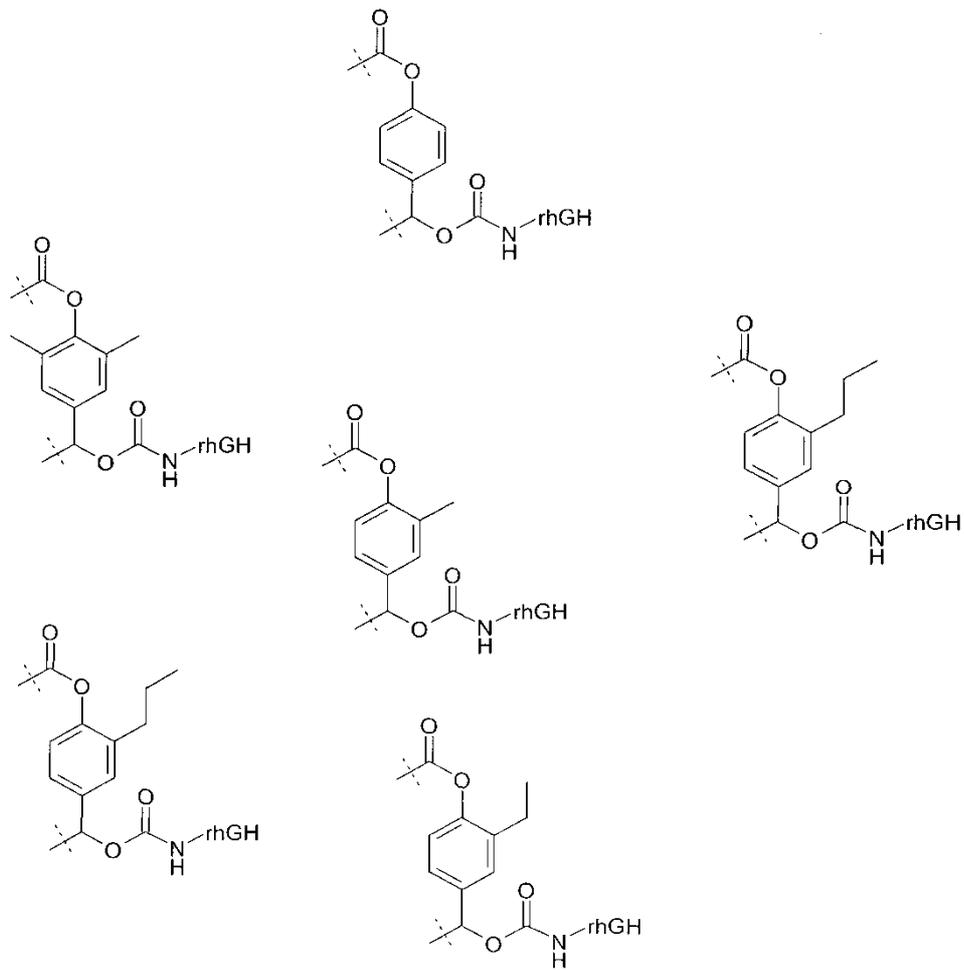
Estructuras aromáticas de fórmula II más preferidas, que forman parte de la estructura (A) dentro de la estructura de grupo de unión aromática general anterior:



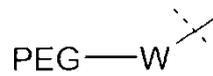
5

Fórmula II

y en la que los ejemplos preferidos de fórmula II comprenden:



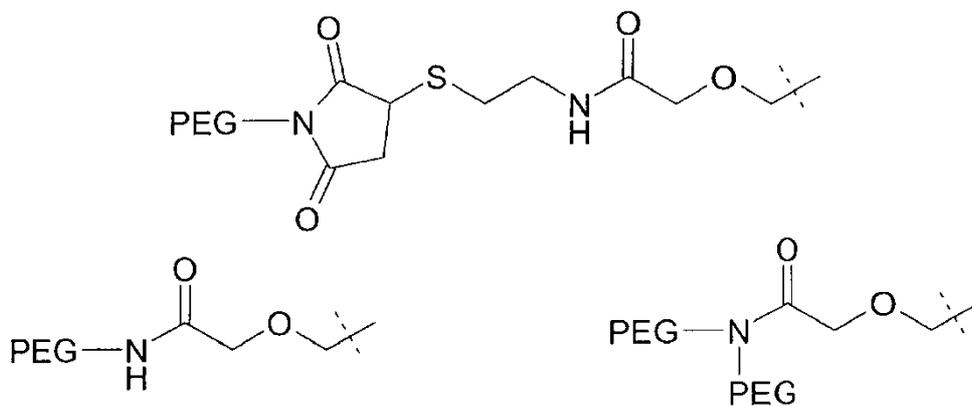
Estructuras de fórmula III más preferidas, que forman parte de la estructura (A) dentro de la estructura de grupo de unión aromática general anterior, en la que PEG-X es

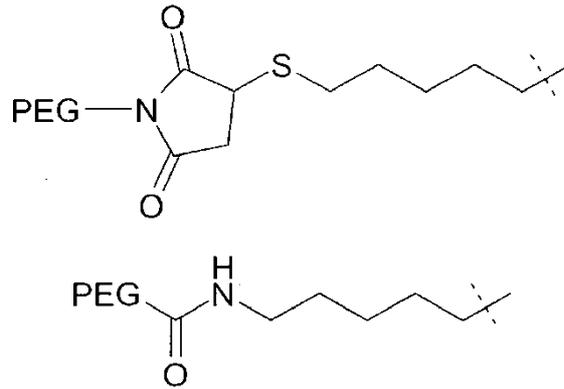


5

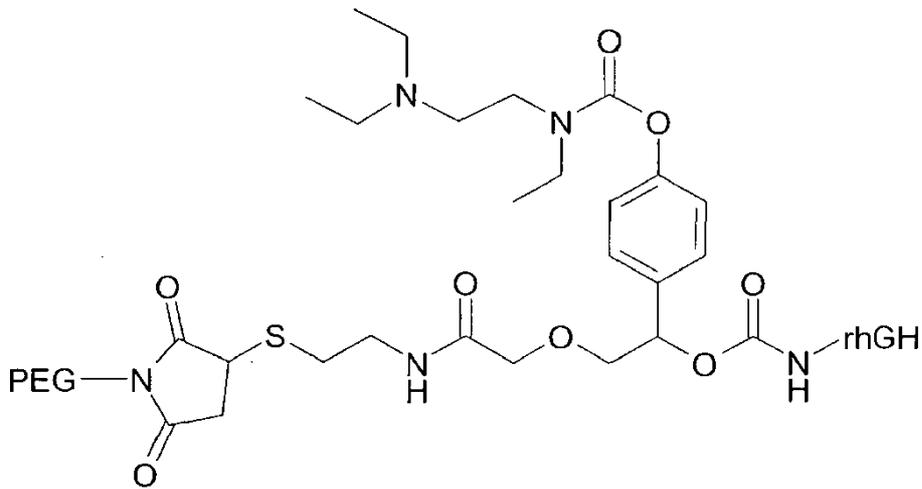
Fórmula III

y PEG-W incluye los siguientes grupos sustituyentes:

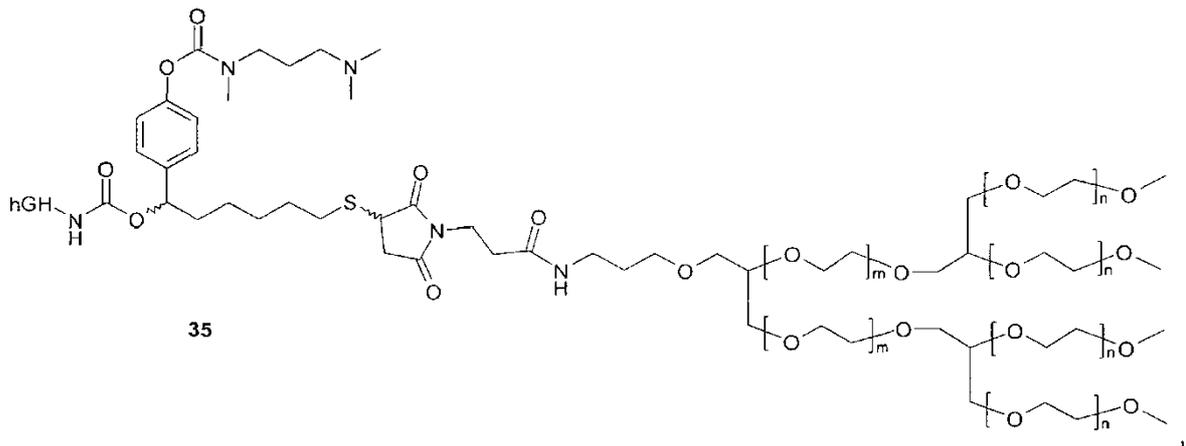




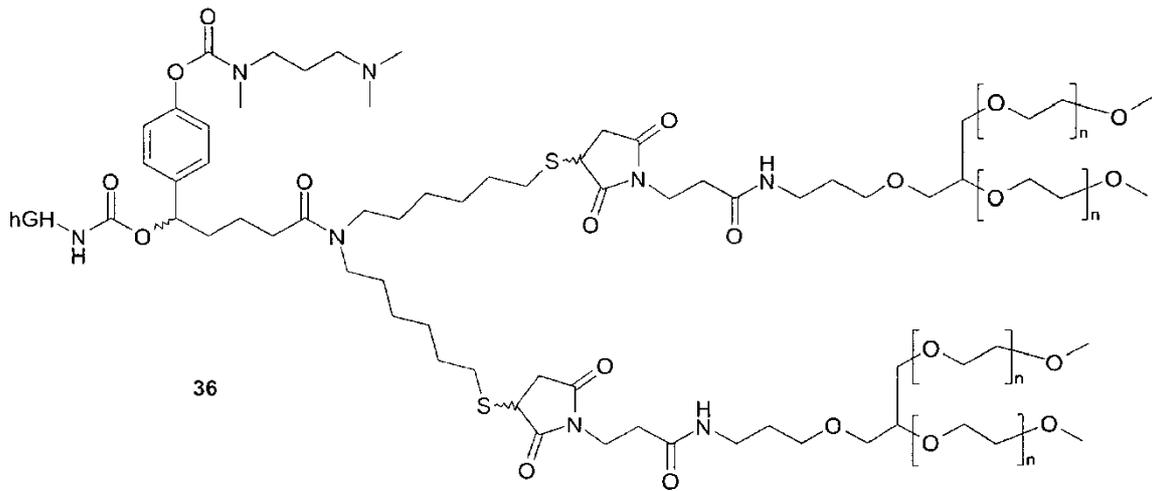
Un ejemplo de conjugados de profármaco preferidos se muestra a continuación:



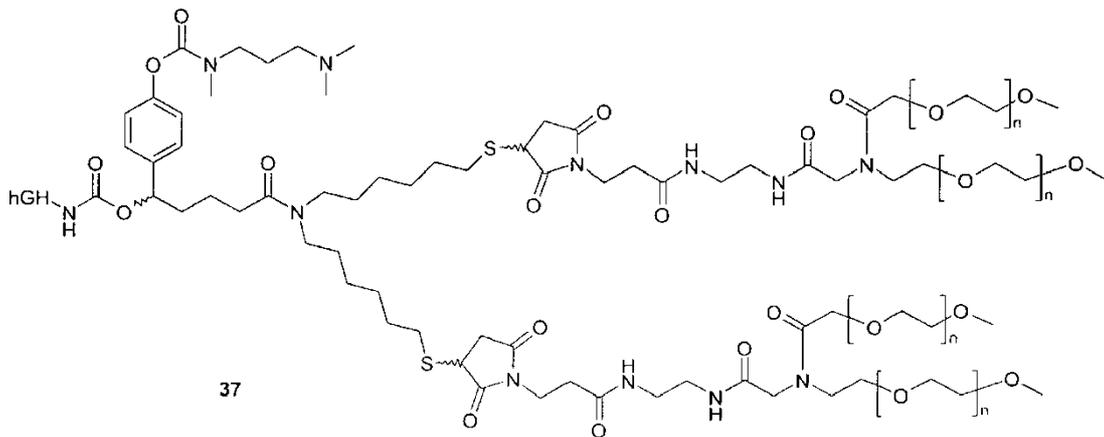
5 En una realización preferida, los profármacos de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en



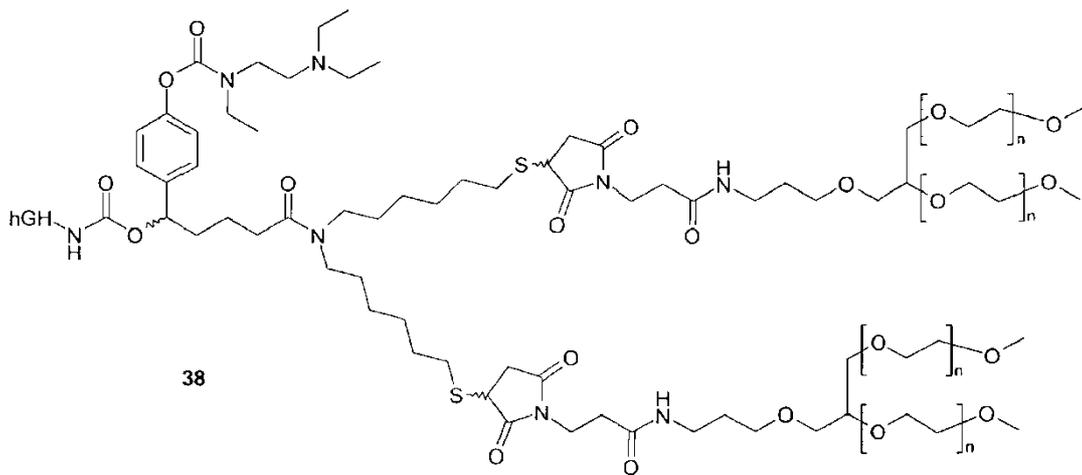
en la que m es un número entero desde 200 hasta 250 y n es un número entero desde 100 hasta 125;



en la que n es un número entero desde 400 hasta 500;



en la que n es un número entero desde 400 hasta 500; y



5

en la que n es un número entero desde 400 hasta 500.

Los profármacos de la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Ensayos para determinar las propiedades funcionales de profármaco pegilado de rhGH

Actividad y semivida del conjugado

Para determinar la actividad y la semivida del conjugado de profármaco descrito en el presente documento, es necesario sintetizar un conjugado "permanente", que no experimenta autohidrólisis, es decir un conjugado permanente.

- 5 Esto se logra sintetizando una molécula idéntica al profármaco pegilado de rhGH, aparte de modificando la parte de la estructura del grupo de unión, que inicia la autoescisión. Tal compuesto correspondiente tendrá actividad residual y semivida circulante del conjugado idénticas a la del profármaco pegilado de rhGH. Más generalmente, para cualquier profármaco conjugado con grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescisión) puede preverse sintetizar una molécula idéntica al profármaco, aparte de la capacidad para experimentar autoescisión, realizando una modificación menor de la estructura del grupo de unión.

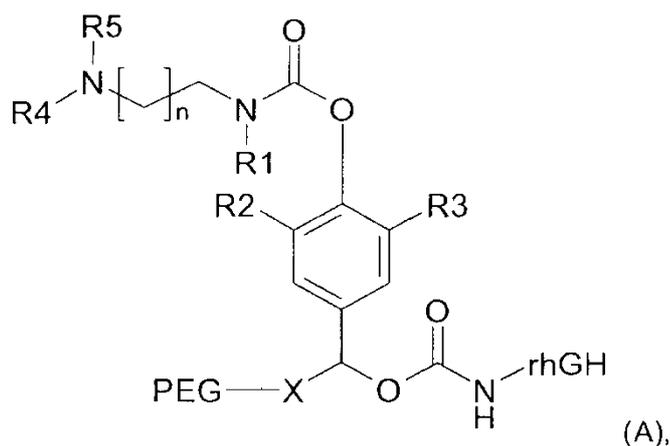
15 El motivo de usar el conjugado correspondiente es que si el grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescisión) tal como se describe en el presente documento se aplica al ensayo mencionado en el ejemplo 1, el conjugado comenzará obviamente de manera inmediata a liberar el fármaco sin modificar, lo que influirá en los resultados del ensayo. En otras palabras, no es posible medir la actividad residual sin preparar un conjugado permanente ya que el fármaco nativo inalterado, por ejemplo rhGH, se liberará y contribuirá a la actividad medida. Esto resulta obvio para el experto.

20 Por este motivo tal como se explicó anteriormente, la actividad residual de los profármacos conjugados con grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescisión) se expresan como la actividad de los conjugados permanentes correspondientes. Los conjugados permanentes se preparan de modo similar a los profármacos conjugados con grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescisión) (ejemplos 20 a 23), pero con una modificación menor de la estructura del grupo de unión, de modo que el grupo de unión ya no puede experimentar autoescisión. La preparación de conjugados permanentes se describe en el ejemplo 10 al ejemplo 19.

El profármaco pegilado de rhGH tal como se describe en el presente documento se caracteriza porque:

- (1): el conjugado tiene una actividad GH que es menor del 5% de la hormona de crecimiento nativa sin PEG; y
- 25 (2): la velocidad de autohidrólisis de grupo de unión es tal que la semivida *in vivo* es de desde 10 horas hasta 600 horas que se mide mediante inyección intravenosa en ratas del conjugado, seguido por la extracción de muestras de sangre a intervalos de tiempo, preparación de plasma y análisis de hGH usando ELISA; y

en el que el conjugado de profármaco pegilado tiene la estructura química (A):



30 en la que

HN-rhGH representa el residuo de rhGH unido al grupo de unión transitorio;

R1, R2, R3, R4, y R5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo;

PEG representa el residuo de pegilación unido al grupo de unión transitorio;

35 $n = 1$ ó 2 ; y

X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12; y

en la que el PEG es ramificado y contiene al menos 3 cadenas.

El ensayo para determinar la propiedad (1) se describe en detalle en el ejemplo de trabajo 1 en el presente documento. Basándose en estas instrucciones detalladas, es trabajo de rutina para el experto medir esta actividad residual del profármaco.

En una realización preferida, la actividad residual de la propiedad (1) es menor del 3%, incluso más preferiblemente menor del 1% y lo más preferiblemente prácticamente inactiva.

El ensayo para determinar la propiedad (2) se describe en detalle en el ejemplo de trabajo 2 en el presente documento. Basándose en estas instrucciones detalladas, es trabajo de rutina para el experto medir esta velocidad de autoescisión del grupo de unión transitorio del profármaco.

En una realización preferida, la semivida *in vivo* de velocidad de autoescisión es tal que la semivida *in vivo* es de desde 20 horas hasta 300 horas, más preferiblemente desde 20 horas hasta 150 horas, incluso más preferiblemente desde 30 horas hasta 150 horas, incluso más preferiblemente desde 30 horas hasta 100 horas, incluso más preferiblemente desde 40 horas hasta 100 horas incluso más preferiblemente desde 50 hasta 75 horas y también incluso más preferiblemente desde 30 hasta 75 horas.

Correlación in vivo e in vitro

Se sabe a partir de solicitudes de patente previas de la empresa Ascendis Pharma (Complex Biosystems Company) que existe una correlación entre las velocidades de escisión de grupo de unión *in vitro* e *in vivo*. Puede predecirse fácilmente la cinética de liberación *in vivo* a partir de los datos experimentales *in vitro*.

Lipoatrofia

Tal como se describió anteriormente, la lipoatrofia es lipólisis que se produce en estrecha proximidad del sitio de inyección. Por tanto, puede usarse la medición de la lipólisis *in vitro* de hormona de crecimiento y conjugados de hormona de crecimiento para estimar el efecto de lipoatrofia de los conjugados.

Para determinar el efecto lipolítico del conjugado de profármaco descrito en el presente documento, es necesario sintetizar un "conjugado permanente, que no experimenta autohidrólisis, es decir un conjugado permanente.

El ensayo para determinar la lipoatrofia se describe en detalle en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento. Basándose en estas instrucciones detalladas, es trabajo de rutina para el experto medir la lipoatrofia.

En una realización preferida, el conjugado de profármaco pegilado de rhGH, tal como se describe en el presente documento, tiene un efecto de lipoatrofia que es comparable al de la hormona de crecimiento humana, medido según el ensayo para determinar la lipoatrofia del ejemplo 3 y otras condiciones de régimen de dosificación idénticas.

Enfermedades relacionadas con GH

El término una enfermedad "relacionada con GH" del segundo aspecto se refieren simplemente en el presente documento a enfermedades y estados en los que un ser humano podría beneficiarse de GH.

Esto incluye, deficiencia de hormona de crecimiento, deficiencia de hormona de crecimiento de inicio en la edad adulta, síndrome de Turner, síndrome de Prader-Willi, síndrome del intestino corto, insuficiencia renal crónica, pequeño para la edad gestacional (SGA), emaciación debida al SIDA, antienvjecimiento, artritis reumatoide, talla baja idiopática, gen de caja homeo de talla baja y somatopausia. También se incluye otro estado de talla baja, que incluye síndrome de Noonan, displasia esquelética, síndrome de Down, talla baja asociada con el uso prolongado de esteroides, síndrome de Aarskog, entre otros.

También se incluyen enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento de TARGA (VIH/HALS niños); talla baja en niños nacidos con un peso al nacer muy bajo (VLBW) pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; talla baja idiopática (ISS); DHC en adultos; fracturas en o de huesos largos, tales como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpos, metatarsos y dedos; fracturas en o de huesos esponjosos, tales como el cráneo, la base de la mano y la base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos por ejemplo en la mano, la rodilla o el hombro; osteogénesis por distracción; trastornos que resultan de artroplastia de cadera o de discos, reparación de

menisco, fijación de prótesis o artrodesis vertebrales, tal como en la rodilla, cadera, el hombro, el tobillo, la muñeca o la mandíbula; trastornos que resultan de la fijación de material de osteosíntesis, tal como clavos, tornillos y placas; pseudoarticulación o consolidación defectuosa de fracturas; trastornos que resultan de osteotomía, por ejemplo de la tibia o el dedo gordo; trastornos que resultan de la implantación de injertos; degeneración de cartílago articular en la rodilla provocada por traumatismo o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (PADC); enfermedad cardiovascular asociada con desnutrición en PADC; reversión de caquexia en PADC; cáncer en PADC; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en PADC; VIH en PADC; ancianos con PADC; enfermedad hepática crónica en PADC, síndrome de fatiga en PADC; enfermedad de Crohn; insuficiencia hepática; hombres con infecciones por VIH; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado con VIH (HALS); esterilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor programada, deshabitación de alcohol/drogas o traumatismo neurológico; envejecimiento; ancianos frágiles; osteoartritis; cartílago dañado de manera traumática; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; traumatismo craneoencefálico; hemorragia subaracnoidea; un peso al nacer muy bajo; metabólico síndrome de; miopatía por glucocorticoides; y talla baja debida a tratamiento con glucocorticoides en niños.

15 Figuras

En las figuras, se muestra lo siguiente.

La figura 1 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de conjugados PEG-hGH permanentes purificados, en la que el carril 1: patrón proteico de alto peso molecular preteñido HiMark™; carril 2: compuesto 23; el carril 3: compuesto 23; el carril 4: compuesto 25; el carril 5: compuesto 26, el carril 6: compuesto 33; el carril 7: compuesto 32; el carril 8: compuesto 28; el carril 9: compuesto 28; el carril 10: compuesto 28; el carril 11: compuesto 30; el carril 12: compuesto 34; el carril 13: compuesto 34; el carril 14: compuesto 27; el carril 15: compuesto 29.

La figura 2 muestra el cromatograma de exclusión molecular de la disolución de reacción extinguida de la síntesis del conjugado 28 y el cromatograma de exclusión molecular de 28 purificado.

La figura 3 muestra la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico del conjugado 35 y el cromatograma de exclusión molecular de 35 purificado.

La figura 4 muestra la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico del conjugado 36 y el cromatograma de exclusión molecular de 36 purificado.

La figura 5 muestra la purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico del conjugado 37 y el cromatograma de exclusión molecular de 37 purificado.

La figura 6 muestra cromatogramas de exclusión molecular de muestras del conjugado 35 incubadas en tampón a pH 7,4 y 37°C en diversos puntos de tiempo.

La figura 7 muestra curvas de respuesta farmacodinámica del conjugado 36.

Ejemplos

Métodos

35 RP-HPLC analítica y preparativa

Se realizó RP-HPLC analítica/ESI-EM en equipos de Waters que consisten en un gestor de muestras 2695, un detector de absorbancia dual 2487 y un instrumento de ESI ZQ 4000 equipado con una columna de 5 µm Reprosil Pur 300 Å ODS-3 (75 x 1,5 mm) (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania; velocidad de flujo: 350 µl/min, gradiente típico: acetonitrilo al 10-90% en agua, TFA al 0,05% a lo largo de 5 min). Para RP-HPLC preparativa, se usó un controlador Waters 600 y un detector de absorbancia dual 2487 equipado con las siguientes columnas (Reprosil Pur 300 Å ODS-3)

A): 100x20 mm, velocidad de flujo de 10 ml/min, gradiente típico: acetonitrilo al 10-90% en agua, TFA al 0,1% a lo largo de 11 min o

B): 100x40 mm (partículas de 10 µm), velocidad de flujo de 40 ml/min, gradiente típico: acetonitrilo al 10-90% en agua, TFA al 0,1% a lo largo de 11 min.

Cromatografía de intercambio catiónico

5 Se realizó la purificación de conjugados mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un sistema ÄKTA Explorer (GE Healthcare) equipado con una columna Macrocap SP. Se aplicó el conjugado respectivo en tampón acetato de sodio 20 mM pH 4 a la columna que se equilibró previamente en tampón acetato de sodio 20 mM pH 4 (tampón A). Se lavó la columna con tres volúmenes de columna de tampón A para retirar cualquier cantidad de reactivo PEG sin reaccionar. Se eluyeron los conjugados usando un gradiente de tampón B al 10-60% (acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 4,5) a lo largo de 20 volúmenes de columna o tampón B al 0-40% a lo largo de 20 volúmenes de columna y luego B al 40-80% a lo largo de tres volúmenes de columna. La velocidad de flujo era de 7 ml/min y se monitorizó el eluyente mediante detección a 280 nm.

Cromatografía de intercambio aniónico

10 Se realizó la purificación de conjugados mediante cromatografía de intercambio aniónico usando un sistema ÄKTA Explorer (GE Healthcare) equipado con una columna Source Q. Se aplicó el conjugado respectivo en tampón Tris 20 mM/HCl pH 7,5 (tampón C) a la columna que se equilibró previamente en tampón C. Se lavó la columna con tres volúmenes de columna de tampón C para retirar cualquier cantidad de reactivo PEG sin reaccionar. Se eluyeron los conjugados usando un gradiente de tampón D al 0-20% (Tris 20 mM/HCl, cloruro de sodio 1 M, pH 7,5) a lo largo de 25 volúmenes de columna. La velocidad de flujo era de 5 ml/min y se monitorizó el eluyente mediante detección UV a 280 nm. Alternativamente, se usó el sistema de tampón de bis-tris 20 mM/HCl, pH 6,5 (tampón E) y bis-tris 20 mM/HCl, cloruro de sodio 1 M, pH 6,5 (tampón F).

Cromatografía de exclusión molecular analítica

20 Se realizó un análisis mediante cromatografía de exclusión molecular analítica en un sistema ÄKTA Explorer (GE Healthcare). Se analizaron muestras usando una columna Superdex 200 o Sepharose 6 (10 x 300 mm) y se usó fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 135 mM, pH 7,4 como fase móvil. La velocidad de flujo para la columna era de 0,75 ml/min y se detectaron la hGH y los conjugados polímero-hGH eluidos a 215 nm y 280 nm.

Determinación de actividad de reactivos de mPEG-grupo de unión activados por pfp

25 Se disolvió una cantidad definida de reactivo de mPEG-grupo de unión activado por pfp (3-5 mg) en 100 µl de agua. Se añadieron 10 µl de NaOH 0,5 M y se hizo reaccionar la mezcla de reacción durante 60 min a 40°C. Se añadieron 1,5 µl de TFA y se analizó el 10% de esta mezcla mediante RP-HPLC analítica. Se registraron los cromatogramas a 260 y 280 nm. Se integró el pico correspondiente a pentafluorofenol. Se compararon los valores determinados con una curva de calibración adecuada generada mediante el análisis de cantidades definidas de pfp mediante RP-HPLC analítica y la integración de los cromatogramas registrados a 260 y 280 nm.

30 Análisis mediante SDS-PAGE

Se analizaron los conjugados mPEG-hGH permanentes usando geles de Tris-acetato NuPAGE® Novex (1,5 mm de grosor, 15 carriles), tampón de corrida de Tris-acetato-SDS NuPAGE, patrón proteico de alto peso molecular preteñido HiMark™ y Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen). En cada carril, se aplicaron 0,2-0,6 µg de conjugado y se realizaron la electroforesis y la tinción posterior según el protocolo del proveedor.

35 **Ejemplo 1: Ensayo para medir la actividad de hGH y el profármaco pegilado de hGH**

40 Se mide la actividad biológica de hGH usando ensayos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Tal como se describe en el documento EP1715887B1 y también tal como se analizó anteriormente, puede medirse la actividad biológica asociada con la hGH nativa o modificada (por ejemplo una hGH pegilada), usando ensayos de proliferación de células FDC-P1 convencionales, (Clark *et al.*, Journal of Biological Chemistry 271: 21969-21977) o ensayo de unión a receptor (documento US5057417).

45 En la línea 8 (página 14) de la patente EP1715887B1, se describe que la actividad *in vitro* preferida tiene que ser tan alta como sea posible, lo más preferido la hGH modificada tiene una actividad biológica equivalente o mejorada *in vitro*. En la presente invención, la actividad biológica tiene que ser tan baja como sea posible en comparación con hGH nativa. Por tanto, los presentes inventores hicieron completamente lo opuesto en comparación con la técnica anterior descrita en el documento EP1715887B1.

Ensayo *in vitro*

50 Se determinan las actividades *in vitro* de los conjugados PEG-hGH permanentes descritos en los ejemplos a continuación usando uno o más ensayos convencionales para evaluar la actividad biológica *in vitro*. Los ensayos convencionales que pueden emplearse incluyen ensayos de proliferación celular usando, por ejemplo, células FDC-PI (véase, por ejemplo, Clark *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 271:21969-21977, 1996) o células Ba/F3-hGHR,

que expresan receptores para hGH, hGH delta 135-146, o células de linfoma de rata Nb2, que proliferan en respuesta a hGH mediante los receptores lactogénicos (véase, por ejemplo, Alam, K. S., *et al.*, J. Biotech 28 de febrero de 2000, 78(1), 49-59). También pueden usarse ensayos de unión a receptor (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.057.417).

- 5 Nb2-11 es un clon de la línea de linfoma de rata Nb-2 que se derivó de un trasplante de un linfoma que se desarrolló en el timo/ganglio linfático de una rata de raza noble (Nb) macho tras el tratamiento prolongado con estrógenos. Las células son del origen de células pre-T y su proliferación depende de lactógenos de mamífero, tales como prolactina. Nb2-11 también pueden estimularse de manera mitógena mediante IL-2. La inyección de células Nb2 en ratas Nb da lugar a tumores malignos que son altamente sensibles al tratamiento con alcaloides de la vinca. El análisis cariotípico ha mostrado que la línea celular tiene sólo cinco anomalías cromosómicas bien desarrolladas. Las células no expresan inmunoglobulina de superficie, y se confirma su dependencia de los lactógenos. Están disponibles protocolos para el uso células Nb2-11 en bioensayos de ECACC a petición.

- 15 Tal como se describe en el documento WO2006102659 en la página 74, párrafo 0240, ejemplo 7, la actividad biológica de hGH y los conjugados descritos en el presente documento se evaluará *in vitro* usando un ensayo de proliferación de células de linfoma de rata NB2-11. En resumen, se incuban células NB2-11 derivadas de un linfoma de rata con hGH, lo que conduce a la unión de la molécula de hGH a su receptor en la célula superficie. La unión a receptor induce la cascada de transducción de señales, lo que da como resultado la proliferación de las células. Los resultados del ensayo se basan en el contenido de proteína determinado, y una bioactividad del 100% de hGH sin modificar.

20 Conclusión:

Basándose en las instrucciones detalladas de este ejemplo 1 es trabajo de rutina para el experto medir esta actividad residual del profármaco.

Ejemplo 2: Ensayo para medir la velocidad de autoescisión del grupo de unión transitorio del profármaco.

Determinación de semivida *in vitro*

- 25 Para la determinación de la velocidad de escisión de grupo de unión *in vitro* de conjugados PEG-grupo de unión-hGH, se disuelven los compuestos en tampón a pH 7,4 (por ejemplo fosfato de sodio 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 3 mM) y se filtra la disolución a través de un filtro de 0,22 µm y se incuba a 37°C. Se toman muestras a intervalos de tiempo y se analizan mediante RP-HPLC o cromatografía de exclusión molecular a 215 nm. Se integran los picos correspondientes a hGH liberada y se representan gráficamente frente al tiempo de incubación. Se aplica software de ajuste de curvas para determinar velocidad de escisión de primer orden.

Determinación de la semivida *in vivo* y correlación de semivida *in vitro/in vivo*

Se determinan velocidades de escisión de grupo de unión *in vivo* comparando la farmacocinética de los conjugados PEG-hGH permanentes con el conjugado transitorio PEG-grupo de unión-hGH respectivo que porta el mismo resto de PEG después de inyección intravenosa en la rata.

- 35 En primer lugar, se inyecta el conjugado PEG-hGH permanente por vía intravenosa en ratas y se toman muestras de sangre a intervalos de tiempo, se prepara plasma y se analiza para determinar hGH usando un ELISA.

En segundo lugar, se inyecta el conjugado PEG-hGH transitorio por vía intravenosa en ratas, se toman muestras de sangre a intervalos de tiempo, se prepara plasma y se analiza para determinar hGH usando un ELISA.

- 40 Se calcula la semivida *in vivo* a partir de la razón de concentración de hGH de conjugado transitorio dividida entre la concentración de hGH de conjugado permanente en los puntos de tiempo respectivos y el ajuste de curvas. Se comparan los datos con las mediciones de semivida *in vitro*.

Conclusión

Basándose en las instrucciones detalladas de este ejemplo 2 es trabajo de rutina para el experto medir la semivida *in vivo* del profármaco pegilado de hGH.

45 **Ejemplo 3: Ensayo para medir la lipoatrofia**

Tal como se dijo anteriormente, el compuesto PHA-794428 es una hGH pegilada y se describe en la patente EP1715887 de la empresa Pharmacia. Según www.clinicaltrials.gov, se terminó el estudio el 10 de diciembre de

2007. La decisión de Pfizer de terminar el programa se debió a casos de lipoatrofia en el sitio de inyección que se notificaron en estudios clínicos de fase 2 después de una única inyección de PHA 794428. Lipoatrofia es el término que describe la pérdida localizada de tejido adiposo y es visible en seres humanos como orificios en la piel (visibles a simple vista).

5 Ensayo

Existen varios métodos *in vitro* descritos en la técnica en la medida de la lipoatrofia. Se describe una propuesta en la publicación J. Anim. Sci (1972), 35: 794-800 (L.J. Machlin) en la página 795. Se encuentra otra descripción en Int. J. Cancer; 80, 444 - 447 (1999).

Generalmente, puede medirse la lipoatrofia tal como se propone a continuación.

- 10 El efecto lipolítico puede determinarse usando un ensayo *in vitro* que consiste en adipocitos de mamífero aislados, preferiblemente adipocitos murinos. Se incubaron las muestras que iban a someterse a ensayo en condiciones fisiológicamente relevantes con un número predeterminado de adipocitos en tampón bicarbonato de Krebs-Ringer que contenía los nutrientes apropiados durante hasta 6 horas. Se determina la concentración de glicerol liberado mediante métodos convencionales, por ejemplo enzimáticamente o mediante una detección radiométrica. Se analizan muestras de control que contienen adipocitos solos para determinar la liberación espontánea de glicerol.
- 15

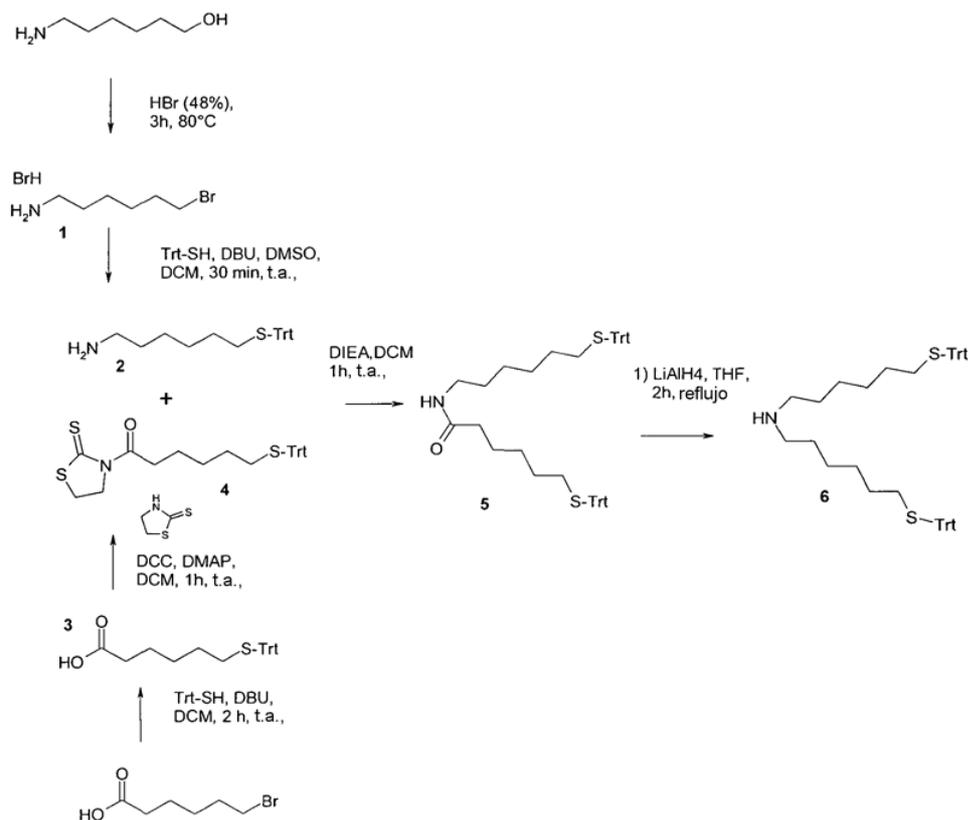
El efecto lipolítico de hormona de crecimiento humana recombinante nativa sin modificar y hormona de crecimiento humana recombinante pegilada de manera permanente se compara con el de hormona de crecimiento humana recombinante pegilada de manera transitoria.

Conclusión

- 20 Basándose en las instrucciones detalladas de este ejemplo 3 es trabajo de rutina para el experto medir el efecto de lipoatrofia.

Ejemplo 4 Síntesis del reactivo de grupo de unión permanente 12a y los reactivos de grupo de unión transitorio 12b y 12c

Síntesis del compuesto 6



ES 2 587 400 T3

Se disolvió 6-amino-hexan-1-ol (2,85 g, 24,3 mmol) en HBr ac. (al 48%, 10 ml, 89 mmol) y se agitó a 80°C durante 3 h. Se evaporó el HBr en exceso a 50-65°C y 15 Torr y se secó el residuo a vacío.

1: Rendimiento de 6,07 g (96%)

EM $[M+H]^+$ = 180,3 g/mol (PM+H calculado = 180,0 g/mol)

- 5 Se añadió DBU (3,5 ml, 23,2 mmol) a una suspensión de clorhidrato de 6-bromohexilamina 1 (3,03 g, 11,6 mmol) y se añadieron trifenil-metanotiol (2,14 g, 7,74 mmol) en DCM (25 ml) y DMSO (13 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente y se diluyó con agua (150 ml).

Se extrajo la fase acuosa con éter y se evaporó la fase orgánica combinada. Se purificó 2 mediante RP-HPLC.

2: Rendimiento de 1,17 g (40%)

- 10 EM $[M+H]^+$ = 376,7 g/mol (PM+H calculado = 376,2 g/mol)

- 15 Se añadió DBU (4,56 ml, 30,0 mmol) a ácido 6-bromo-hexanoico (3,90 g, 20,0 mmol) y trifenil-metanotiol (11,1 g, 40,0 mmol) en DCM (40 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió H₂SO₄ 1 M enfriado con hielo (50 ml) y se extrajo la mezcla con DCM. Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. Se purificó el compuesto 3 mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (200 ml) usando heptano/acetato de etilo (4/1, R_f=0,2) como fase móvil.

3: Rendimiento de 5,83 g (75%)

- 20 Se añadió DMAP (37 mg, 0,31 mmol) a ácido 6-tritilsulfanil-hexanoico 3 (5,83 g, 14,9 mmol), tiazolidin-2-ona (3,56 g, 29,9 mmol) y dicitlohexilcarbodiimida (3,08, 14,9 mmol) en DCM (100 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h se añadió HCl 1 M (0,6 ml) y se filtró la mezcla. Se concentró el filtrado a vacío y se purificó 4 mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (180 ml) usando heptano/acetato de etilo (1/1) como fase móvil.

4: Rendimiento de 7,15 g (97%) como un aceite amarillo

- 25 Se añadió una disolución de 1-(2-tioxo-tiazolidin-3-il)-6-tritilsulfanil-hexan-1-ona 4 (1,53 g, 3,11 mmol) en THF (13 ml) a lo largo de un periodo de 2 min a 6-tritilsulfanil-hexilamina 2 (1,17 g, 3,11 mmol) en DMSO (1 ml) y THF (5 ml). Después de la adición de trietilamina (435 µl, 3,11 mmol) se agitó la mezcla de reacción durante 90 min a temperatura ambiente. Se añadieron éter (200 ml) y agua (100 ml) y se separaron las fases. Después de la extracción de la fase acuosa con éter, se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ y se concentraron a vacío. Se purificó el compuesto 5 mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (150 ml) usando heptano/acetato de etilo (2/1, R_f=0,1) como fase móvil.

- 30 5: Rendimiento de 1,23 g (53%)

EM $[M+Na]^+$ = 770,6 g/mol (PM+Na calculado = 770,4 g/mol)

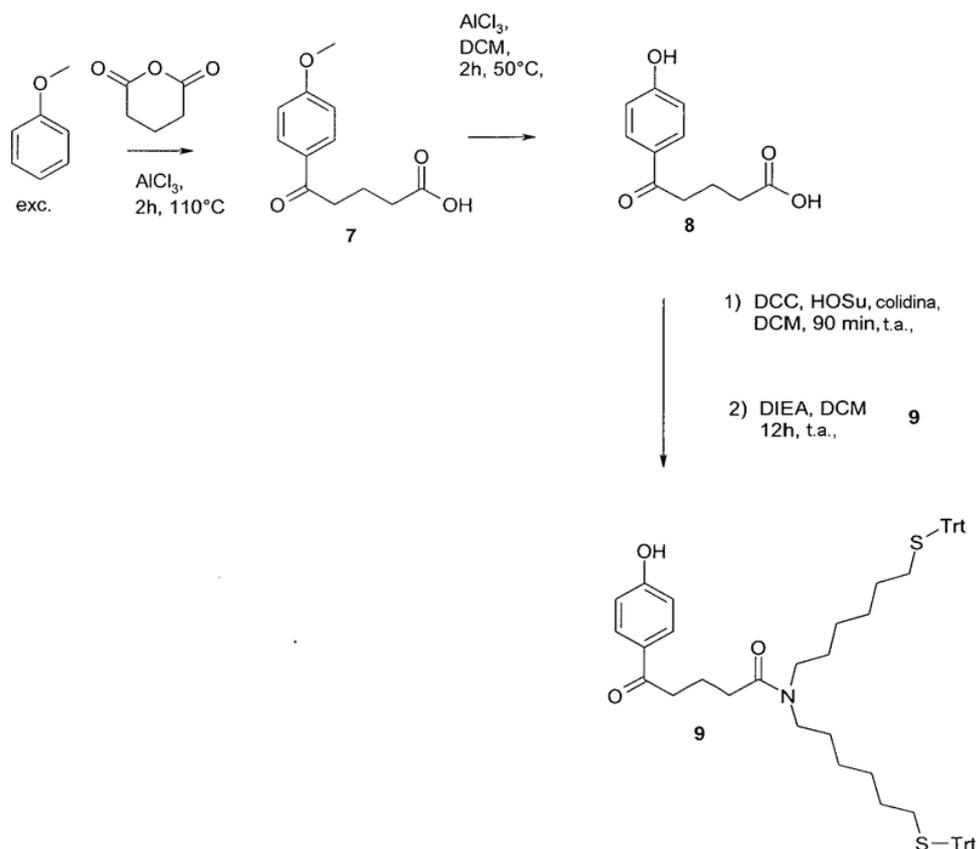
- 35 Bajo nitrógeno, se puso una disolución 1 M de LiAlH₄ en THF (1,2 ml, 4,8 mmol) en un matraz seco y se añadió una disolución de 5 (509 mg, 0,680 mmol) en 10 ml de THF a lo largo de 4 min. Se agitó la mezcla a reflujo durante 2 h, hasta que se mostró la conversión completa del material de partida mediante cromatografía en capa fina (heptanos/acetato de etilo 1:1). Se extinguió cuidadosamente la mezcla de reacción con una suspensión 10:1 de agua en dietil éter hasta que se hubo detenido el desprendimiento de gas. Se vertió la mezcla en 50 ml de una disolución saturada de tartrato de potasio y sodio y se agitó durante 90 min. Se añadieron 90 ml de acetato de etilo y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 20 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (30 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró para dar un aceite transparente. Se adsorbió 6 sobre sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (30 g de sílice, CH₂Cl₂/MeOH 20:1 (v/v) + NEt₃ al 0,1%). Se obtuvo el producto como un aceite viscoso blanquecino.

- 40 6: Rendimiento de 270 mg (54%)

EM $[M+H]^+$ = 734,4 g/mol (PM+H calculado = 734,4 g/mol)

R_f = 0,28 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1)

- 45 Síntesis del compuesto 9



5 Se añadió AlCl_3 (23,0 g, 172,3 mmol) a anhídrido glutárico (10,0 g, 86,2 mmol) en anisol (85 ml, 781 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta 110°C durante 2 h, se enfrió hasta temperatura ambiente, se vertió sobre HCl 3 N/hielo y se extrajo con diclorometano. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (4 x 20 ml), y se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con salmuera (30 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron para dar un aceite rojo que se recristalizó en tolueno. Se obtuvo el producto 7 como un sólido blanquecino.

7: Rendimiento de 5,2 g (48%)

EM $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 245,8$ (PM+Na calculado = 245,1 g/mol)

10 Se añadió AlCl_3 (9,0 mg, 68 mmol) a 7 (5,0 g, 23 mmol) en 1,2-dicloroetano. Se agitó la mezcla de reacción durante 14 h a 85°C y posteriormente se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadió HCl 1 N enfriado con hielo (50 ml) y se extrajo la mezcla con acetato de etilo (4 x 30 ml). Se secaron las fracciones orgánicas combinadas sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a vacío para dar un sólido de color rojo claro que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

8: Rendimiento de 3 g (62%)

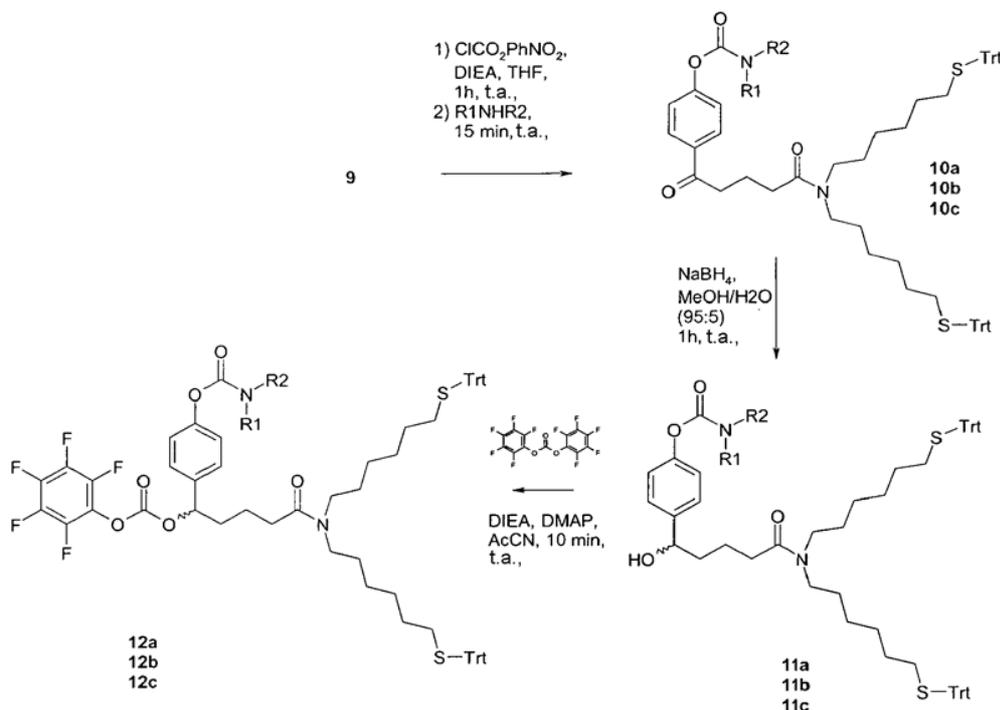
15 EM $[\text{M}+\text{H}]^+ = 209,1$ (PM+H calculado = 209,1 g/mol)

20 Se agitaron dicitlohexilcarbodiimida (532 mg, 2,6 mmol), el ácido 8 (403 mg, 1,9 mmol), HOSu (297 mg, 2,6 mmol) y colidina (1,0 ml, 7,8 mmol) en DCM (10 ml) durante 90 min a temperatura ambiente. Después de la retirada de dicitlohexilurea mediante filtración, se añadieron la amina 6 (947 mg, 1,3 mmol) en DCM (5 ml) y DIEA (450 μl , 2,6 mmol) al filtrado y se hizo reaccionar la mezcla durante 14 h a temperatura ambiente. Se añadió H_2SO_4 1 N (2 x 50 ml) y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 20 ml), y se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (30 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a vacío. Se purificaron los residuos mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (150 ml) usando heptano/acetato de etilo (1/2, $R_f = 0,66$) como fase móvil.

9: Rendimiento de 819 mg (69%)

25 EM $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 946,4$ (PM+Na calculado = 946,4 g/mol)

Síntesis del reactivo de grupo de unión permanente 12a y el reactivo de grupo de unión transitorio 12b y 12c



a: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Et}$

b: $\text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = 2\text{-(diethylamino)etilo}$

5 c: $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = 3\text{-(dimetilamino)propilo}$

Se disolvió 9 (1 eq., 175 mg, 0,19 mmol) en THF seco (1,5 ml), se añadieron cloroformiato de p-nitrofenilo (1,1 eq., 42 mg, 0,21 mmol) y DIPEA (2 eq., 66 μl , 0,38 mmol) y se agitó la mezcla durante 60 min a temperatura ambiente. Se añadió dietilamina ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Et}$, 2 eq., 39 μl , 0,38 mmol) y se continuó con la agitación durante 15 min. Se eliminó el disolvente a vacío, se añadieron 100 μl de AcOH y se purificó 10a mediante RP-HPLC.

10 EM $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1045,9$ (PM+Na calculado = 1045,5 g/mol)

Se añadió NaBH_4 (5 eq., 37 mg, 0,95 mmol) a la fracción de HPLC que contenía 10a (acetonitrilo/H₂O ~ 3/1 (v/v) + TFA al 0,1%) y se hizo reaccionar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió una porción adicional de NaBH_4 (5 eq., 37 mg, 0,95 mmol) y se agitó la mezcla de reacción hasta que se indicó la conversión completa del material de partida mediante análisis de CL/EM (10 min a temperatura ambiente). Se purificó 11a mediante RP-HPLC y se liofilizó.

15

11a: Rendimiento de 95 mg (49% basado en 9)

EM $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+ = 1047,7$ (PM+Na calculado = 1047,5 g/mol)

Se disolvió 9 (1 eq., 175 mg, 0,19 mmol) en THF seco (1,5 ml), se añadieron cloroformiato de p-nitrofenilo (1,1 eq., 42 mg, 0,21 mmol) y DIPEA (2 eq., 66 μl , 0,38 mmol) y se agitó la mezcla durante 60 min a temperatura ambiente. Se añadió N,N,N'-trietil-etano-1,2-diamina ($\text{R}_1 = \text{Et}$, $\text{R}_2 = 2\text{-(diethylamino)etilo}$, 2 eq., 68 μl , 0,38 mmol) y se continuó con la agitación durante 15 min. Se añadieron 100 μl de AcOH, se eliminó el disolvente a vacío y se purificó 10b mediante RP-HPLC y se liofilizó.

20

10b: Rendimiento de 147 mg como sal de TFA (65%)

EM $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1116,4$ (PM+Na calculado = 1116,6 g/mol)

25 Se sintetizó 10c tal como se describió anteriormente usando N,N,N'-trimetil-propano-1,3-diamina ($\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = 3\text{-(dimetilamino)propilo}$)

(dimetilamino)propilo, 56 μ l, 0,38 mmol) como diamina.

10c: Rendimiento de 134 mg como sal de TFA (59%)

EM $[M+Na]^+$ = 1088,4 (PM+Na calculado = 1088,6 g/mol)

5 Se añadió $NaBH_4$ (46 mg, 1,2 mmol) a 10b (147 mg, 0,12 mmol) en MeOH/agua = 95:5 (v/v) (3 ml) en dos dosis y se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la adición de AcOH (300 μ l) y concentración, se purificó el producto 11b mediante RP-HPLC y se liofilizó.

11b: Rendimiento de 107 mg como sal de TFA (73%)

EM $[M+Na]^+$ = 1118,4 (PM+Na calculado = 1118,6 g/mol)

Se sintetizó 11c según el mismo protocolo.

10 11c: Rendimiento de 65 mg como sal de HCl (54%) a partir de 134 mg de material de partida

EM $[M+Na]^+$ = 1090,4 (PM+Na calculado = 1090,6 g/mol)

15 Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadieron carbonato de bis-pentafluorofenilo (2,5 eq., 25 mg, 63 μ mol), DMAP (1 mg) y DIEA (5 eq., 22 μ l, 127 μ mol) a 11a (1 eq., 26 mg, 26 μ mol) en acetonitrilo seco (0,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a temperatura ambiente, se enfrió hasta 0°C y se acidificó con AcOH (200 μ l). Se purificó el producto 12a mediante RP-HPLC y se liofilizó.

12a: Rendimiento de 13 mg (42%)

EM $[M+Na]^+$ = 1258,2 (PM+Na calculado = 1257,5 g/mol)

Se prepararon 12b y 12c de manera correspondiente a partir de 11b (56 mg, 48 μ mol) y 11c (88 mg, 73 μ mol), respectivamente.

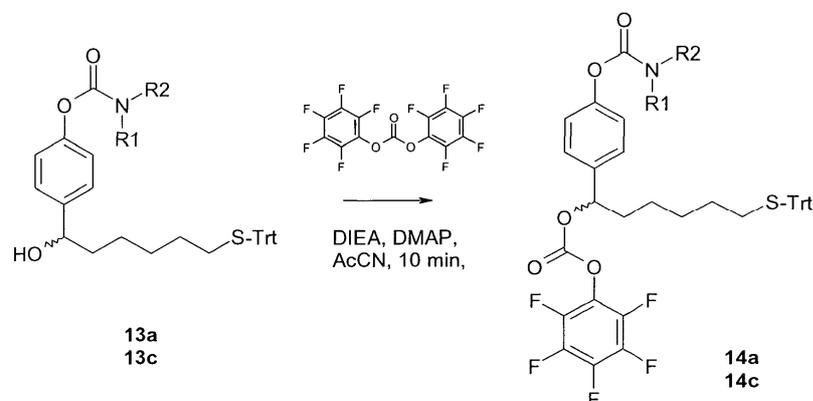
20 12b: Rendimiento de 63 mg como sal de TFA (93%)

EM $[M+H]^+$ = 1306,3 (PM+H calculado = 1306,6 g/mol)

12c: Rendimiento de 41 mg como sal de TFA (41%)

EM $[M+H]^+$ = 1278,4 (PM+Na calculado = 1278,5 g/mol)

25 **Ejemplo 5 Síntesis del reactivo de grupo de unión permanente 14a y los reactivos de grupo de unión transitorio 14c**



a: R1 = R2 = etilo

c: R1 = Me, R2 = 3-(dimetilamino)propilo

Se sintetizaron 13a and 13c tal como se describe en el documento WO2005/099768A2.

5 Bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadieron carbonato de bispentafluorofenilo (631 mg, 1,6 mmol), DMAP (20 mg, 0,16 mmol) y DIEA (556 μ l, 3,2 mmol) a 13a (364 mg, 0,64 mmol) en acetonitrilo seco (5 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min a temperatura ambiente, se enfrió hasta 0°C y se acidificó con ácido acético (1 ml). Se purificó el producto 14a mediante RP-HPLC y se liofilizó.

14a: Rendimiento de 379 mg (77%)

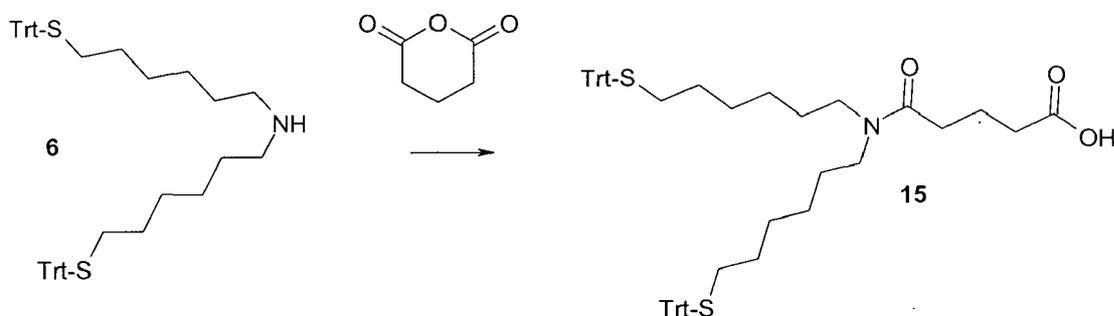
EM $[M+Na]^+$ = 800,4 (PM+Na calculado = 800,3 g/mol)

Se preparó 14c de manera correspondiente a partir de 13c (97 mg, 130 μ mol).

14c: Rendimiento de 114 mg como sal de TFA (94%)

10 EM $[M+H]^+$ = 821,5 (PM+H calculado = 821,3 g/mol)

Ejemplo 6 Síntesis del reactivo de grupo de unión permanente 15



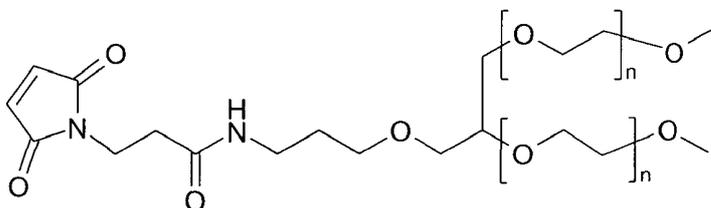
15 Se agitaron anhídrido glutárico (0,41 mmol), la amina 6 (200 mg, 0,27 mmol), DIPEA (72 μ l, 0,41 mmol) y DMAP (11 mg, 0,09 mmol) en acetonitrilo (3 ml) durante 2 h a 80°C. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se añadió ácido acético (200 μ l). Se purificó el producto 15 mediante RP-HPLC y se liofilizó.

15: Rendimiento de 130 mg (57%)

EM $[M+Na]^+$ = 870,2 (PM+Na calculado = 870,4 g/mol)

Ejemplo 7 Síntesis de reactivos de mPEG-grupo de unión activados

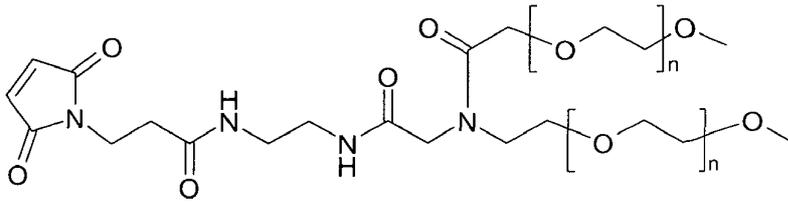
Materiales de partida de mPEG-maleimida:



20

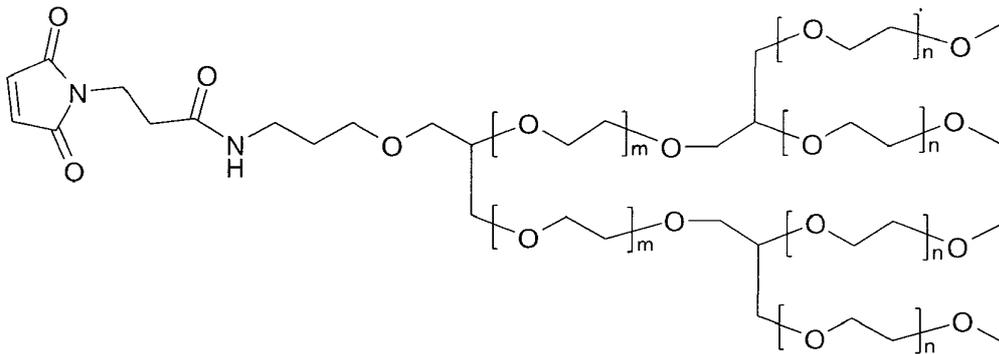
mPEG-maleimida 1A: PM = aprox. 20 kDa (n = aprox. 200-250)

mPEG-maleimida 1B: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 400-500)



mPEG-maleimida 2A: PM = aprox. 20 kDa (n = aprox. 200-250)

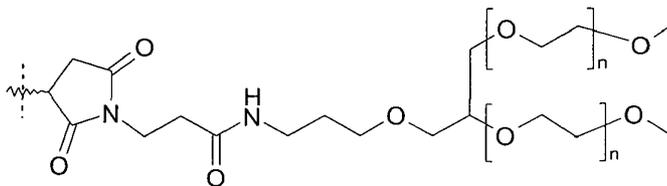
mPEG-maleimida 2B: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 400-500)



5 mPEG-maleimida 3A: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 100-125; m = aprox. 200-250)

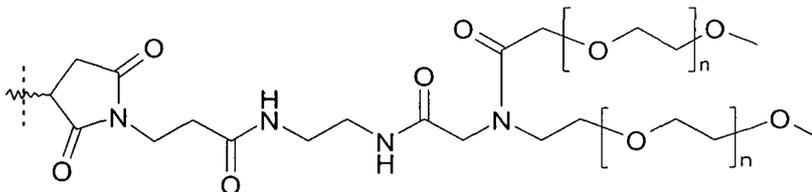
mPEG-maleimida 3B: PM = aprox. 80 kDa (n = aprox. 200-250; m = aprox. 400-500)

Residuos de mPEG después de reaccionar con grupo tiol (R3 en las estructuras a continuación):



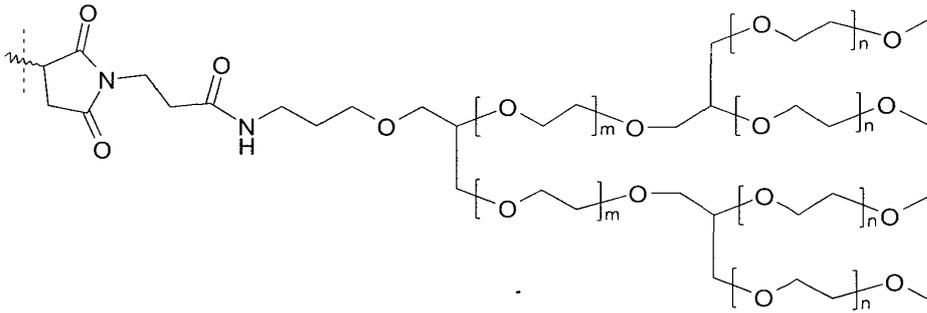
residuo de mPEG-succinimida 1AA: PM = aprox. 20 kDa (n = aprox. 200-250)

10 residuo de mPEG-succinimida 1BA: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 400-500)



residuo de mPEG-succinimida 2AA: PM = aprox. 20 kDa (n = aprox. 200-250)

residuo de mPEG-succinimida 2BA: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 400-500)

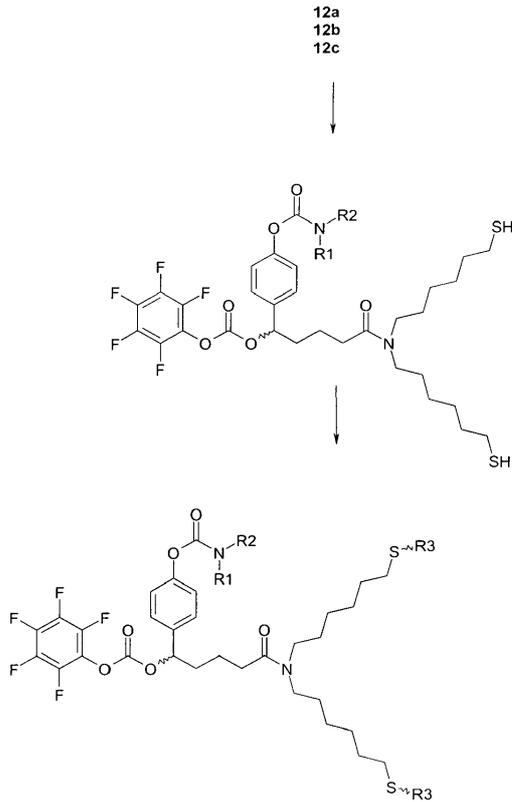


residuo de mPEG-succinimida 3AA: PM = aprox. 20 kDa (n = aprox. 100-125; m = aprox. 200-250)

residuo de mPEG-succinimida 3BA: PM = aprox. 40 kDa (n = aprox. 200-250; m = aprox. 400-500)

La línea discontinua vertical indica el sitio de unión al grupo tiol en la estructura respectiva

- 5 Síntesis de los reactivos de mPEG-grupo de unión activados por pfp permanentes 17aa, 17ab, 17ac, 17ad y los reactivos de mPEG-grupo de unión activados por pfp transitorios 17b, 17ca y 17cb



16a: R1=R2=etilo

16b: R=etilo, R2=2-(dietilamino)etilo

16c: R1=Me, R2=3-(dimetilamino)propilo

17aa: R1=R2=etilo, R3=1AA

17ab: R1=R2=etilo, R3=1BA

17ac: R1=R2=etilo, R3=2AA

17ad: R1=R2=etilo, R3=2BA

17b: R=etilo, R2=2-(dietilamino)etilo, R3=1BA

17ca: R1=Me, R2=3-(dimetilamino)propilo, R3=1BA

17cb: R1=Me, R2=3-(dimetilamino)propilo, R3=2BA

Se agitó el carbonato 12a (13 mg, 10 μ mol) en 10 μ l de AcOH, 700 μ l de HFIP, 1 μ l de TFA y 2 μ l de TES durante 10 min a temperatura ambiente. Se eliminaron los componentes volátiles en una corriente de nitrógeno y se purificó 16a mediante RP-HPLC.

16a: Rendimiento de 3,8 mg (5 μ mol)

5 EM [M+H]⁺ = 751,3 (PM+H calculado = 751,3 g/mol)

Se prepararon 16b y 16c de manera correspondiente a partir de 12b (7,7 mg, 5,4 μ mol) y 12c (2 mg, 1,5 μ mol), respectivamente.

16b: Rendimiento de 2,5 mg (2,7 μ mol)

EM [M+Na]⁺ = 845,1 (PM+Na calculado = 844,3 g/mol)

10 16c: Rendimiento de 0,5 mg (0,6 μ mol)

EM [M+Na]⁺ = 816,6 (PM+Na calculado = 816,3 g/mol)

15 Se añadió la mPEG-maleimida 1B (NOF, Japón) (521 mg, 12,7 μ mol) a 3,5 mg (3,9 μ mol) de 16c en 4 ml de acetonitrilo/agua 3/1 (v/v) + TFA al 0,1%. Se añadieron 200 μ l de tampón fosfato 0,5 M pH 7,4 y se hizo reaccionar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió 1 μ l (13 μ mol) de mercaptoetanol y se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4-5 mediante la adición de TFA. Se purificó 17ca mediante RP-HPLC y se liofilizó.

17ca: Rendimiento de 220 mg (actividad de pfp-carbonato del 82%)

Se sintetizó 17cb tal como se describe para 17ca usando 16c (3,5 mg, 3,9 μ mol) y la mPEG-maleimida 2B (656 mg, 16 μ mol).

17cb: Rendimiento de 130 mg (actividad de pfp-carbonato del 85%)

20 Se añadieron 184 mg (8,8 μ mol) de la mPEG-maleimida 1A (NOF, Japón) a 16a (2,0 mg, 2,7 μ mol) en 4 ml de acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) + TFA al 0,1%. Se añadieron 200 μ l de tampón fosfato 0,5 M pH 7,4 y se hizo reaccionar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 μ l (1,6 μ mol) de mercaptoetanol y se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 2-3 mediante la adición de TFA. Se separó 17aa de PEG sin reaccionar mediante RP-

HPLC y se liofilizó.

17aa: Rendimiento de 90 mg (actividad de pfp-carbonato del 88%)

Se sintetizó 17ab tal como se describió anteriormente usando 16a (3,8 mg, 5,0 μmol) y 680 mg (16 μmol) de la mPEG-maleimida 1B (NOF, Japón).

5 17ab: Rendimiento de 250 mg (actividad de pfp-carbonato del 83%)

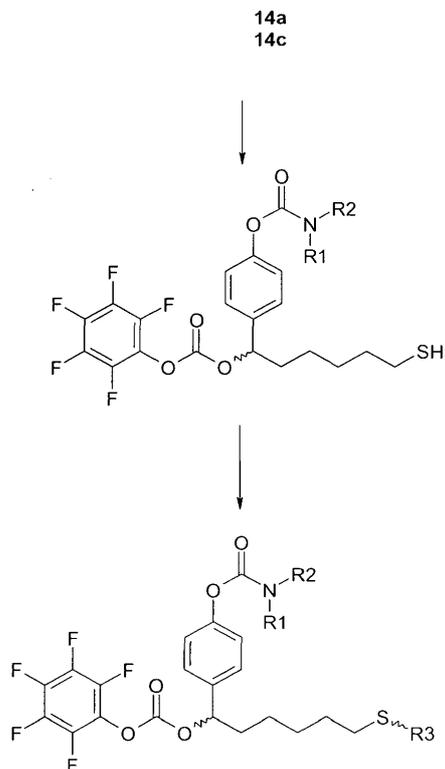
Se sintetizó 17ac tal como se describió anteriormente usando 16a (2,5 mg, 3,3 μmol) y 200 mg (9,5 μmol) de la mPEG-maleimida 2A (Jenkem, RP de China).

17ac: Rendimiento de 80 mg (actividad de pfp-carbonato del 80%)

Puede sintetizarse 17ad tal como se describió anteriormente usando 16a y la mPEG-maleimida 2B.

10 Puede sintetizarse 17b tal como se describe para 17cb usando 16b y la mPEG-maleimida 1B.

Ejemplo 8 Síntesis de los reactivos de mPEG-grupo de unión permanentes activados por pfp 19aa y 19ab y el reactivo de mPEG-grupo de unión permanente transitorio 19c



Se agitó el carbonato 14c (20 mg, 21 μmol) en 10 μl de AcOH, 400 μl de HFIP y 5 μl de TES durante 10 min a temperatura ambiente y se enfrió hasta 0°C. Se añadió acetonitrilo/agua=9/1 (v/v) enfriado con hielo y se separó 18c

mediante RP-HPLC y se liofilizó.

18c: Rendimiento de 5,0 mg como sal de TFA (7,2 μmol)

EM $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 579,6 (PM+H calculado = 579,2 g/mol)

Se sintetizó 18a tal como se describió anteriormente usando el carbonato 14a (24 mg, 31 μmol).

5 18a: Rendimiento de 8,0 mg (15 μmol)

EM $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 536,2 (PM+H calculado = 536,5 g/mol)

10 Se añadieron 205 mg (5 μmol) de la mPEG-maleimida 3A (NOF, Japón) a 18a (4,0 mg, 7,5 μmol) en 2 ml de acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) + TFA al 0,1%. Se añadieron 100 μl de tampón fosfato 0,5 M (pH 7,4) y se hizo reaccionar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 2-3 mediante la adición de TFA y se separó 19aa de PEG sin reaccionar mediante RP-HPLC y se liofilizó.

19aa: Rendimiento de 125 mg (actividad de pfp-carbonato del 85%)

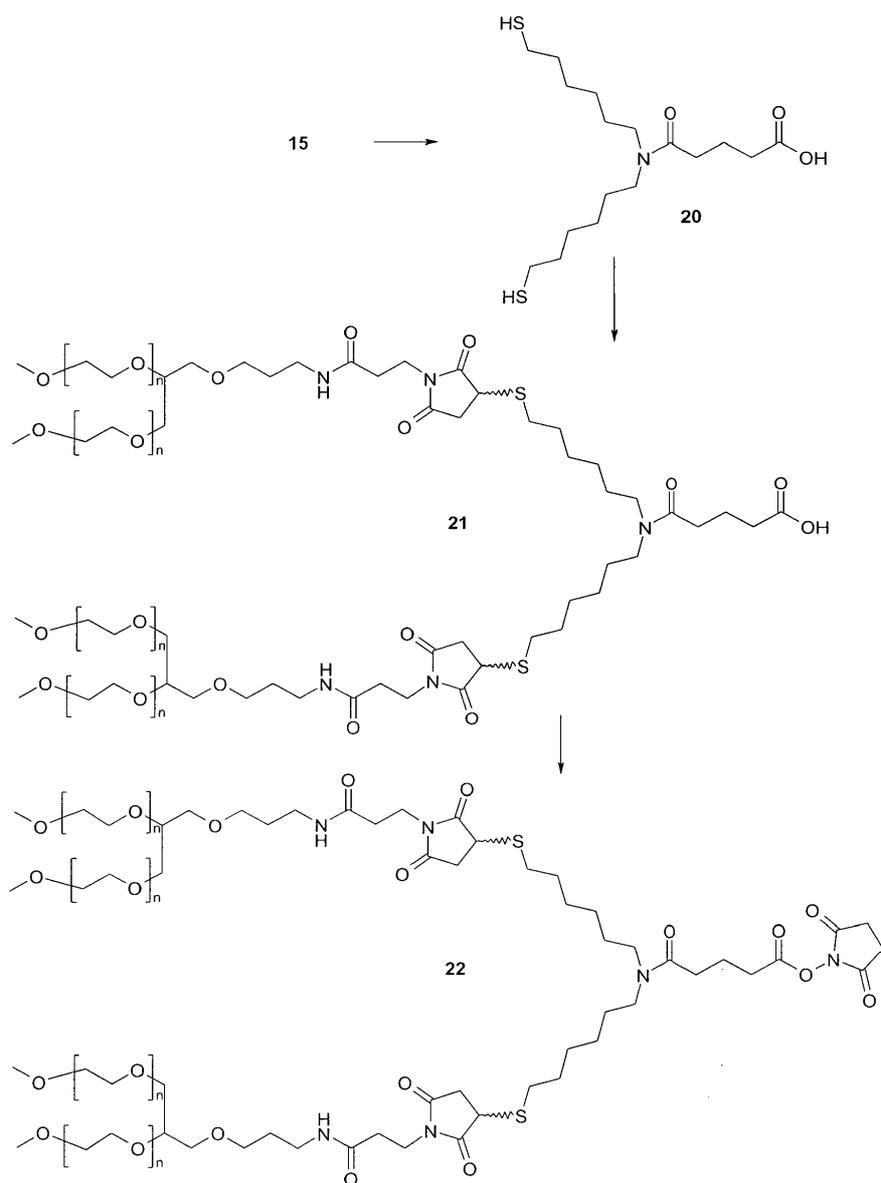
Se preparó 19ab de manera correspondiente a partir de 410 mg (5 μmol) de la mPEG-maleimida 3B (NOF, Japón) y 18a (4,0 mg, 7,5 μmol).

19ab: Rendimiento de 265 mg (actividad de pfp-carbonato del 87%)

15 Se preparó 19c de manera correspondiente a partir de 205 mg de la mPEG-maleimida 3A y 18c (5 mg, 7,2 μmol)

19c: Rendimiento de 120 mg (actividad de pfp-carbonato del 88%)

Ejemplo 9: Síntesis del derivado de éster de NHS-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos permanente 22



Se agitó el ácido 15 (12 mg, 14 μ mol) en 1 ml de TFA, 1 ml de DCM y 10 μ l de TES durante 10 min a temperatura ambiente. Se eliminaron los componentes volátiles en una corriente de nitrógeno y se purificó el ditiol 20 mediante RP-HPLC.

5 20: Rendimiento de 2,9 mg (8 μ mol)

EM $[M+Na]^+$ = 386,8 (PM+ Na calculado = 386,2 g/mol)

Se añadió 20 (1 mg, 2,8 μ mol) en 170 μ l de acetonitrilo a la mPEG-maleimida 1B (NOF, Japón) (380 mg, 9,2 μ mol) en 4 ml de acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) + TFA al 0,1%. Se añadieron 200 μ l de tampón fosfato 0,5 M pH 7,4 y se hizo reaccionar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0,6 μ l (7,8 μ mol) de mercaptoetanol y se acidificó la mezcla de reacción hasta pH 4-5 mediante la adición de TFA. Se cambió el tampón a HCl al 0,005% (columna de desalación HiPREP, 26/10 GE Healthcare) y se liofilizó 21 sin purificación adicional.

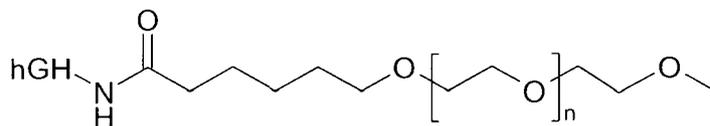
21: Rendimiento de 320 mg

Se disolvió 21 en 50 ml de tolueno y se secó de manera azeotrópica la disolución de polímero durante dos horas a reflujo usando una trampa Dean-Stark. Entonces se enfrió la disolución de polímero hasta temperatura ambiente. Se precipitó el reactivo de mPEG-grupo de unión 21 secado mediante la adición de éter helado (60 ml). Se añadió dicitohexilcarbodiimida (1,2 mg, 6 μ mol) en DCM a una disolución de 21 (240 mg, 3 μ mol) y N-hidroxisuccinimida (0,7 mg, 6 μ mol) en DCM (3 ml). Se agitó la mezcla de reacción durante 14 h a temperatura ambiente y se precipitó

22 mediante la adición de éter frío (20 ml). Se secó a vacío el producto 22.

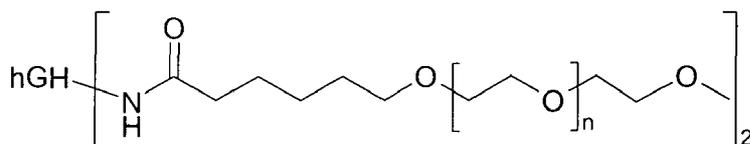
22: Rendimiento de 200 mg

Ejemplo 10: Síntesis de monoconjugado mPEG-hGH con enlaces amida permanente 23 y el bisconjugado mPEG₂-hGH 24 usando el derivado de hexanoato de succinimidilo-mPEG de 40 kDa lineal



5

23



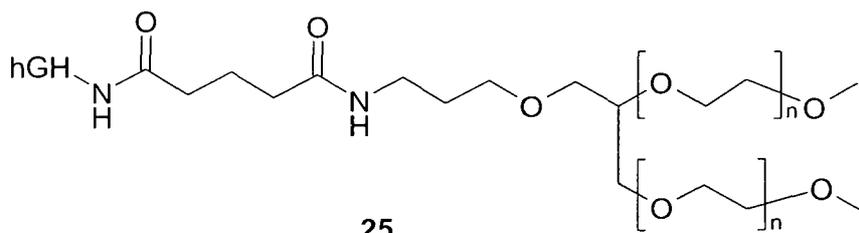
24

10

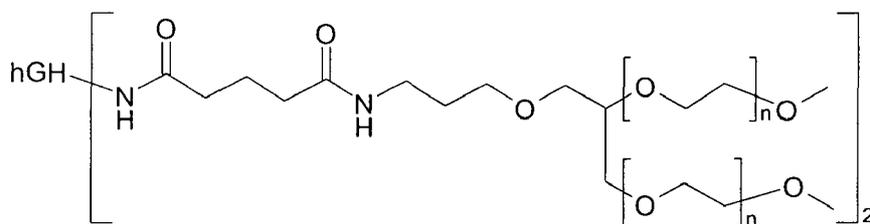
15

Se cambió el tampón de hGH a borato de sodio 50 mM pH 8,5 (alternativamente pueden usarse borato de sodio pH 8 o borato de sodio pH 9). La concentración de hGH era de aproximadamente 2,5 mg/ml. Se disolvió un exceso molar de tres veces de derivado de hexanoato de succinimidilo-mPEG de 40 kDa (NOF, Japón) con relación a la cantidad de hGH en agua para formar una disolución de reactivo al 20% (p/v) (alternativamente puede usarse un exceso molar de cuatro veces o cinco veces). Se añadió la disolución de reactivo a la disolución de hGH y se mezcló. Se incubó la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente y se extinguió con hidroxilamina a temperatura ambiente y pH 7 durante dos horas. Se analizó la mezcla de reacción extinguida mediante cromatografía de exclusión molecular. Se purificaron el monoconjugado 23 y el bisconjugado 24 mediante cromatografía de intercambio catiónico. Alternativamente, puede usarse cromatografía de intercambio aniónico para la purificación. Se analizaron los conjugados purificados mediante SDS-PAGE (figura 1).

Ejemplo 11: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH con enlaces amida permanente 25 y el bisconjugado mPEG-hGH 26 usando el derivado de éster de NHS-mPEG de 40 kDa ramificado



25



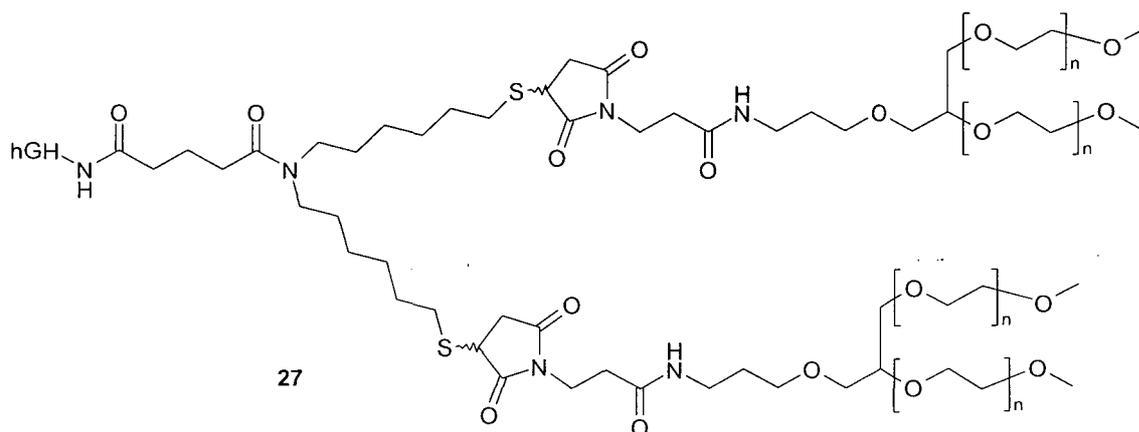
26

20

Se sintetizaron el monoconjugado mPEG-hGH permanente 25 y el bisconjugado 26 según el procedimiento descrito en el ejemplo 10 usando el derivado de éster de NHS-mPEG de 40 kDa ramificado (NOF, Japón). Se analizaron los conjugados purificados mediante SDS-PAGE (figura 1).

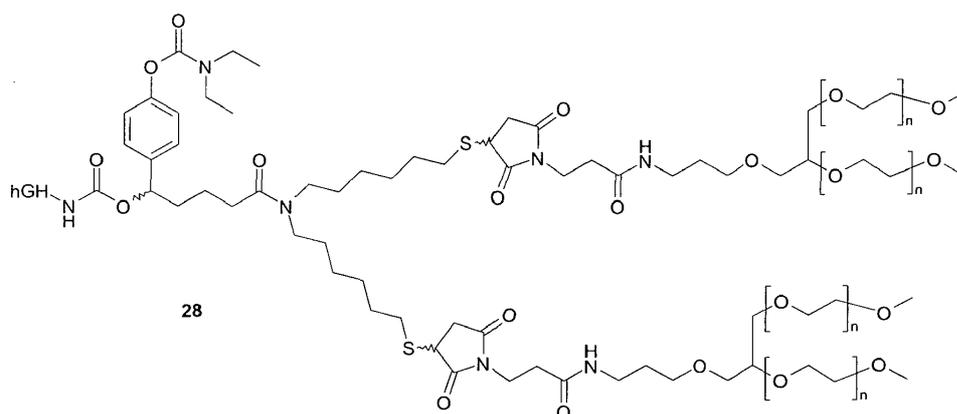
25

Ejemplo 12: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH con enlaces amida permanente 27 usando el derivado de éster de NHS-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos



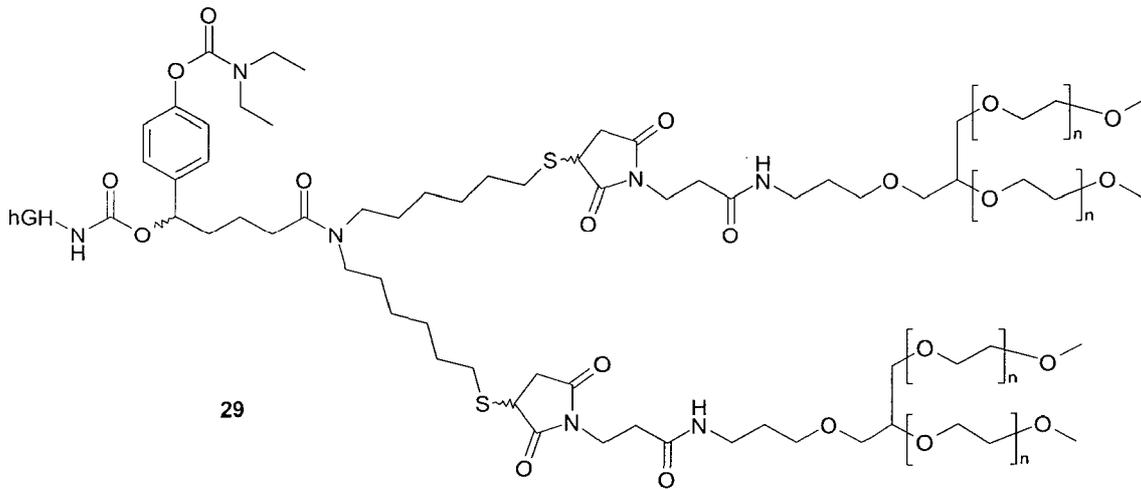
Se describió el monoconjugado mPEG-hGH permanente 27 según el ejemplo 10 usando el derivado de éster de NHS-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 22. Se analizó mediante SDS-PAGE 27 purificado (figura 1).

5 **Ejemplo 13: Síntesis del monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 28 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos 17aa**



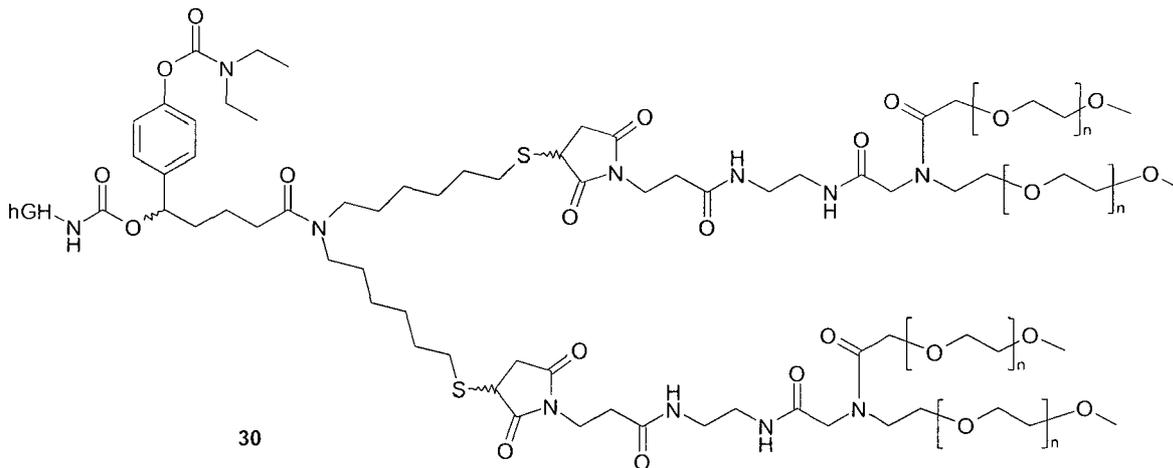
10 Se cambió el tampón de hGH a borato de sodio 50 mM pH 9 (alternativamente pueden usarse borato de sodio pH 8,5 o borato de sodio pH 8). La concentración de hGH era de aproximadamente 2,5 mg/ml. Se disolvió un exceso molar de cuatro veces del reactivo de grupo de unión-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos permanente 17aa con relación a la cantidad de hGH. Se disolvió en agua para formar una disolución de reactivo al 20% (p/v). Se añadió la disolución de reactivo a la disolución de hGH y se mezcló. Se incubó la mezcla de reacción durante 1,5 h a temperatura ambiente y se extinguió mediante incubación en hidroxilamina 100 mM a pH 7 y temperatura ambiente durante 2 h. Se analizó la mezcla de reacción extinguida mediante cromatografía de exclusión molecular (parte superior de la figura 2). Se purificó el monoconjugado mPEG-grupo de unión-hGH permanente 28 mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH 7,5 y se analizó mediante SDS-PAGE (figura 1) y cromatografía de exclusión molecular (parte inferior de la figura 2).

15 **Ejemplo 14: Síntesis del monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 29 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos**



Se sintetizó el monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 29 según el ejemplo 13 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 17ab. Se analizó mediante SDS-PAGE 29 purificado (figura 1).

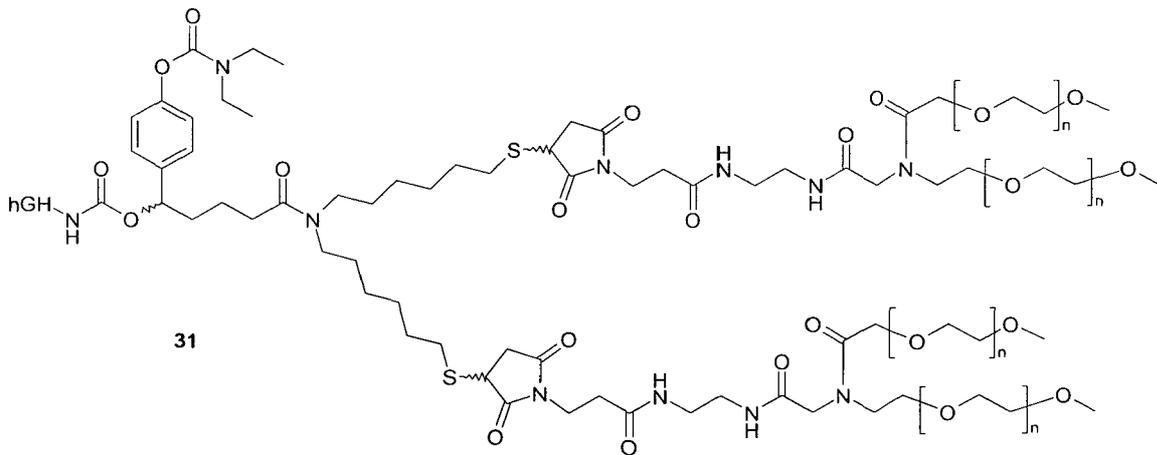
5 **Ejemplo 15: Síntesis del monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 30 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos 17ac**



Se sintetizó el monoconjugado mPEG-hGH permanente 30 según el ejemplo 13 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos 17ac. Se analizó mediante SDS-PAGE 30 purificado (figura 1).

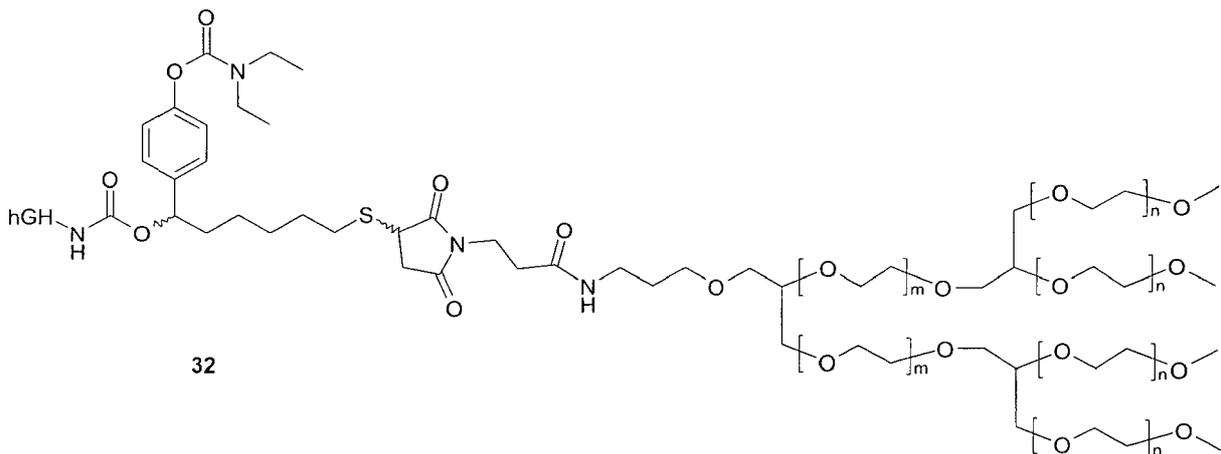
10

Ejemplo 16: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH permanente 31 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos



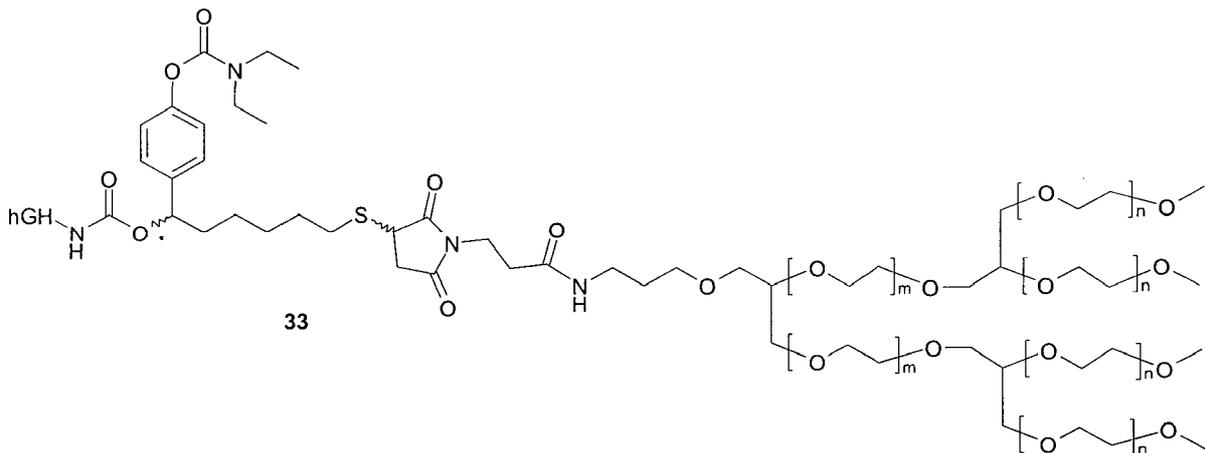
Puede sintetizarse el monoconjugado mPEG-hGH permanente 31 según el ejemplo 13 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 17ad.

- 5 **Ejemplo 17: Síntesis del monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 32 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos**



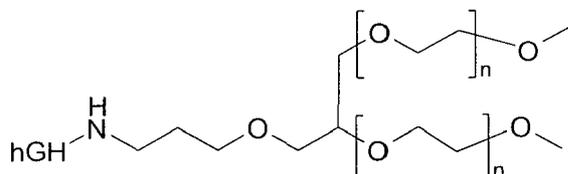
Se sintetizó el monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 32 según el ejemplo 13 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos 19aa. Se analizó mediante SDS-PAGE 32 purificado (figura 1).

- 10 **Ejemplo 18: Síntesis del monoconjugado m-PEG-hGH con enlaces carbamato permanente 33 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos**



Se sintetizó el monoconjugado mPEG-hGH permanente 33 según el ejemplo 13 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 19ab. Se analizó mediante SDS-PAGE 33 purificado (figura 1).

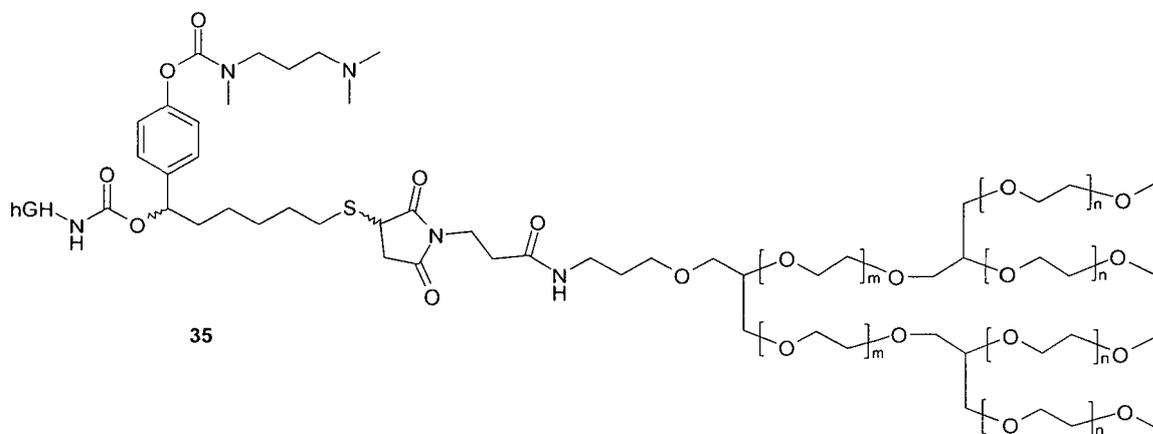
5 **Ejemplo 19: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH con enlaces amina permanente 34 usando el derivado de propionaldehído-mPEG de 40 kDa ramificado**



34

Se cambió el tampón de hGH un tampón MES 50 mM pH 6 (alternativamente se usó tampón HEPES pH 7) y se ajustó la concentración de hGH a 1,5 mg/ml. Se disolvió un exceso molar de tres veces de propionaldehído-mPEG de 40 kDa (GL2-400AL3, NOF, Japón) con relación a la cantidad de hGH en agua para formar una disolución de reactivo al 25% (p/v). Se añadió la disolución de reactivo a la disolución de hGH y se mezcló. Se añadió una alícuota de una disolución madre 1 M de cianoborohidruro de sodio en agua para dar una concentración final de 25 mM en la mezcla de reacción. Se incubó la disolución durante 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se extinguió la reacción mediante la adición de tampón Tris. Se analizó la mezcla de reacción mediante cromatografía de exclusión molecular y se purificó el conjugado 34 mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se analizó mediante SDS-PAGE el monoconjugado mPEG-hGH 34 purificado (figura 1).

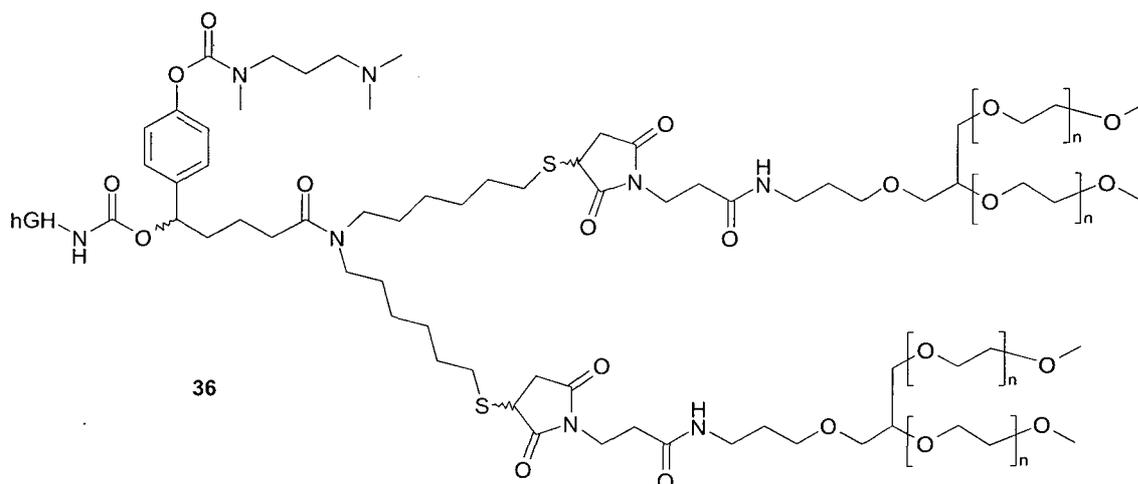
15 **Ejemplo 20: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH con enlaces carbamato transitorio 35 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 40 kDa ramificado de 4 brazos transitorio 19c**



35

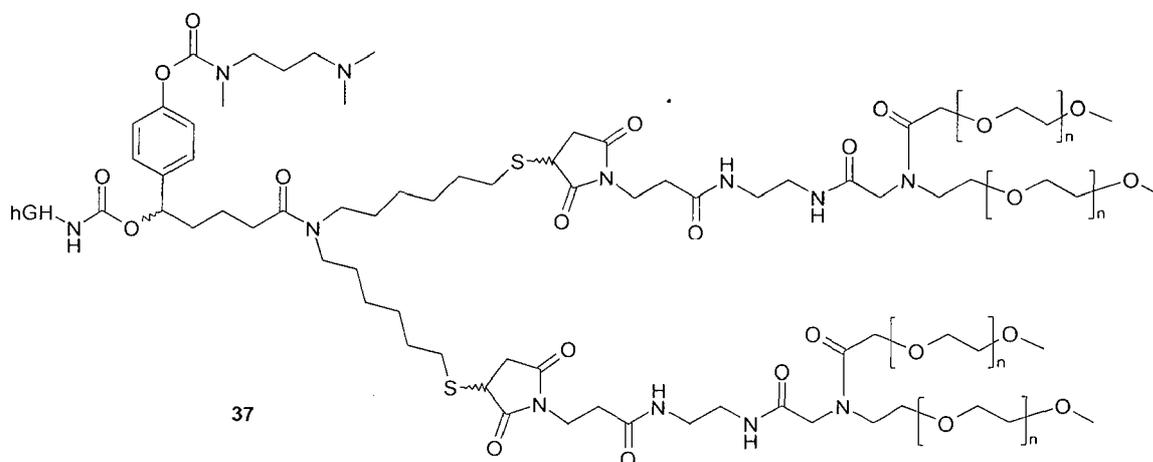
20 Se cambió el tampón de hGH a borato de sodio 50 mM pH 9 (alternativamente pueden usarse borato de sodio pH 8,5 o borato de sodio pH 8) y se ajustó la concentración de hGH a 2,5 mg/ml. Se disolvió un exceso molar de cuatro veces del reactivo de mPEG-grupo de unión transitorio 19c con relación a la cantidad de hGH en agua para formar una disolución de reactivo al 20% (p/v). Se añadió la disolución de reactivo a la disolución de hGH y se mezcló. Se incubó la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente y se extinguió mediante incubación en hidroxilamina 100 mM a pH 7 y temperatura ambiente durante 2 h. Se purificó el monoconjugado mPEG-grupo de unión-hGH mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH 6,5 (figura 3 top) y se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular (parte inferior de la figura 3).

25 **Ejemplo 21: Síntesis del monoconjugado mPEG-grupo de unión-hGH transitorio 36 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos**



Se cambió el tampón de hGH a borato de sodio 100 mM pH 9 (alternativamente pueden usarse borato de sodio pH 8,5 o borato de sodio pH 8) y se ajustó la concentración de hGH a 10 mg/ml. Se disolvió un exceso molar de cuatro veces del reactivo de grupo de unión-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos transitorio 17ca con relación a la cantidad de hGH en agua para formar una disolución de reactivo al 25% (p/v). Se añadió la disolución de reactivo a la disolución de hGH y se mezcló. Se incubó la mezcla de reacción durante 45 min a temperatura ambiente y se extinguió mediante incubación en hidroxilamina 100 mM a pH 7 y temperatura ambiente durante 2 h. Se purificó el monoconjugado mPEG-grupo de unión-hGH 36 mediante cromatografía de intercambio catiónico (parte superior de la figura 4) y se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular (parte de inferior de la figura 4).

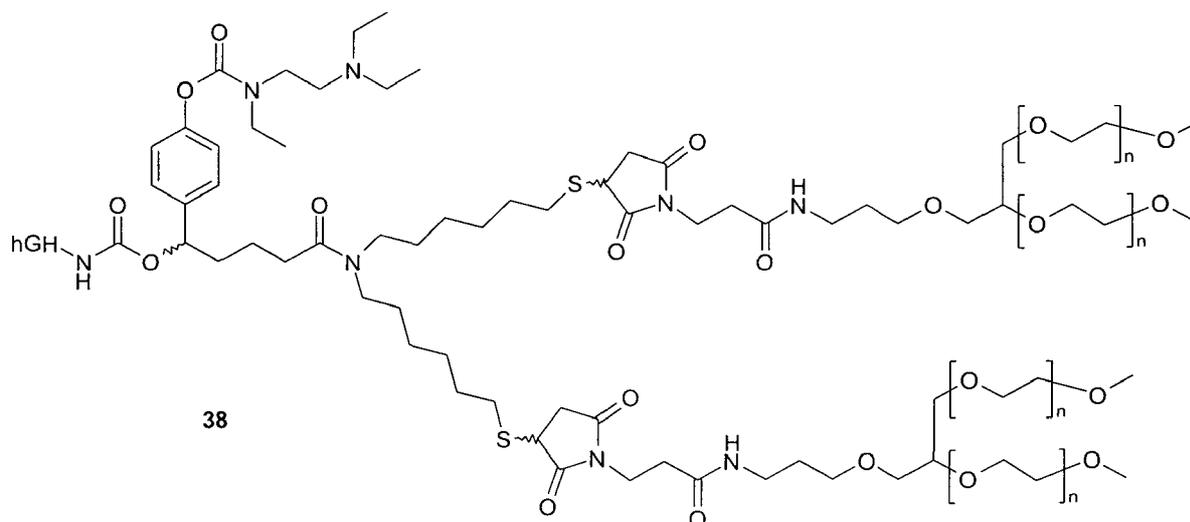
10 **Ejemplo 22: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH transitorio 37 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 17cb**



Se sintetizó el conjugado mPEG-grupo de unión-hGH 37 tal como se describe según el procedimiento descrito en el ejemplo 21 usando el reactivo de mPEG-grupo de unión activado 17cb.

15 En la figura 5, se muestran el cromatograma de intercambio catiónico y el cromatograma de exclusión molecular analítica en la parte superior e inferior, respectivamente.

Ejemplo 23: Síntesis del monoconjugado mPEG-hGH con enlaces carbamato transitorio 38 usando el derivado de carbonato de pentafluorofenilo-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos 17b



Puede sintetizarse el conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 38 tal como se describe en el ejemplo 21 usando el reactivo de grupo de unión-mPEG de 80 kDa ramificado de 4 brazos transitorio 17b.

5 Ejemplo 24: Ensayo para medir la actividad de hGH y el profármaco pegilado de hGH

Es trabajo de rutina para el experto determinar la actividad residual del profármaco polimérico tal como se expresa mediante la actividad del polímero conjugado de polímero permanente correspondiente usando ensayos convencionales tal como se describe en el ejemplo 1.

10 Específicamente, se hicieron crecer células NB2-11 en medios libres de suero con complemento de hGH 100 ng/ml. Para el ensayo de proliferación *in vitro*, se lavó dos veces una suspensión celular que contenía 2×10^5 células/ml con medio libre de suero y libre de hGH y se dispensó a una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (10^4 células/pocillo). Se sometieron a prueba los compuestos por triplicado en una serie de etapas de valoración (9 etapas, usando una dilución de factor 3 entre cada etapa). Se incubaron las células con disoluciones de compuesto durante 48 horas seguido por incubación durante 2,5 horas con el reactivo de proliferación celular WST-1. Se determinó la proliferación de NB2-11 mediante la lectura de la densidad óptica en un lector de ELISA y se representó gráficamente la respuesta en función de la concentración y se determinaron los valores de CE50. Se muestran los resultados como el % de bioactividad residual *in vitro* en relación con hGH sin modificar, que se proporciona en la tabla 1.

20 En los experimentos *in vitro* tal como se describió anteriormente, se usó hGH nativa (fuente Novo Nordisk, Dinamarca) como compuesto de referencia. Se usó la misma preparación de hGH para la síntesis de los conjugados PEG-hGH permanentes.

Tabla 1

Compuesto	Caracterización <i>in vitro</i> : actividad <i>in vitro</i> de conjugados permanentes
HGH nativa (hGH, Novo Nordisk, Dinamarca)	100%
23	10,3%
24	0,4%
25	4,4%
26	0,2%
27	0,7%

Compuesto	Caracterización <i>in vitro</i> : actividad <i>in vitro</i> de conjugados permanentes
28	2,3%
29	0,7%
30	2,0%
32	6,3%
33	2,2%
34	4,8%

Tabla 1: Bioactividad *in vitro* de conjugados de hGH pegilados de manera permanente en comparación con hGH nativa (Norditropin, Novo Nordisk, Dinamarca).

Conclusión:

5 Tal como se observa a partir de la tabla 1, mediante la conjugación de una molécula de PEG adecuada con hGH, puede reducirse la actividad *in vitro* de la hGH pegilada hasta menos del 5% de la actividad de la hGH nativa sin conjugar. Por ejemplo, la conjugación de un PEG ramificado de 4x20 kDa con hGH reduce la actividad residual hasta el 0,7% del patrón de hGH sin conjugar.

10 Además, a partir de estos resultados también se descubrió sorprendentemente, que la actividad residual de la hormona de crecimiento pegilada está relacionada no sólo con el tamaño del PEG unido, sino también con el grado de ramificación y el de separación entre la hGH y los puntos de ramificación dentro de la estructura de PEG.

PEG lineal

Específicamente, la unión de un PEG lineal de 40 kDa a hGH da como resultado una actividad *in vitro* del 10,3% (compuesto 23) en comparación con hGH nativa.

PEG ramificado

15 Cuando se une un PEG ramificado de 2x20 kDa (compuesto 25), se reduce adicionalmente la actividad *in vitro* hasta el 4,4% en comparación con hGH nativa.

Además, cuando se une un PEG de 4x20 kDa con una corta separación entre la y los puntos de ramificación dentro del PEG reactivo (compuestos 27 y 29) se reduce incluso más la actividad *in vitro* hasta el 0,7% respectivamente en comparación con hGH nativa.

20 Sorprendentemente, cuando se une un PEG de 4x20 kDa con un espaciador relativamente largo entre la hormona de crecimiento humana y el primer punto de ramificación dentro del reactivo de PEG (por ejemplo, el compuesto 33) se reduce menos la actividad *in vitro* (2,2%) mostrando la importancia del espaciador entre el grupo funcional de hGH y el primer punto de ramificación dentro del reactivo de PEG ramificado.

25 La conjugación de más de un resto de PEG a la hGH para formar bisconjugados de PEG reduce la actividad *in vitro* hasta menos del 0,5%. (por ejemplo, compuestos 24 y 26).

Ejemplo 25: Determinación de la velocidad de autoescisión *in vitro* de los conjugados 35, 36, 37 y 38

30 Se determinó la velocidad de autoescisión de los conjugados 35, 36 y 37 a pH 7,4 y 37°C tal como se describe en el ejemplo 2. Se determinaron semividas de autoescisión de aproximadamente 75 h para estos conjugados. La figura 6 muestra cromatogramas de exclusión molecular de muestras de 35 incubadas analizadas después de 0 h, 8 h, 47 h, 97 h y 168 h que muestran la liberación lenta de hGH del conjugado 35 a lo largo del tiempo. Puede determinarse la velocidad de autoescisión del conjugado 38 de manera correspondiente y proporciona semividas de aproximadamente 50h.

Ejemplo 26: Ensayo para medir la semivida terminal *in vivo* de los profármacos pegilados de hGH tal como se expresa mediante la semivida del conjugado permanente correspondiente *in vivo*

Se determinó la farmacocinética de los conjugados permanentes después de la inyección intravenosa de 0,25 mg (equivalentes de hGH) en ratas. Para seleccionar un conjugado adecuado para inyecciones semanales en seres humanos, es deseable una semivida en plasma de más de 10 horas en la rata.

5 Se administró por vía intravenosa una dosis única de 0,25 mg de hGH o 0,25 mg de conjugado PEG-hGH permanente (dosis basada en hGH) por rata a ratas Wistar macho (200-250 g). Se usaron dos grupos de dos animales cada uno para cada compuesto. Se extrajeron 200-300 µl de sangre completa por vía sublingual para obtener 100 µl de plasma con Ca-heparina por animal y punto de tiempo. Se tomaron muestras después de 0,5, 3, 24, 48, 72 y 96 h para el grupo 1 y después de 5, 8, 32, 56, 80 y 168 h para el grupo 2. Se almacenaron las muestras de plasma a -80°C hasta que se sometieron a ensayo.

10 Se midieron las concentraciones de hGH y conjugado PEG-hGH usando un kit de ELISA para hGH (DSL). Se calcularon las concentraciones en plasma a partir de una curva de calibración de hGH o el conjugado respectivo y se representaron gráficamente frente al tiempo, y se calculó la semivida terminal ($t_{1/2}$) usando un modelo de un solo compartimento. En la tabla 2, se tabula el resultado de la determinación de la semivida.

15 Para seleccionar un conjugado adecuado para inyecciones semanales en seres humanos, se realizaron estudios farmacocinéticos en ratas. Como la semivida de conjugados pegilados en ratas están en el intervalo de 5 veces más rápido que en seres humanos, la semivida de una hGH pegilada en ratas debe ser de aproximadamente 10 horas o mayor. Para obtener una estimación de la semivida del profármaco pegilado de hGH conjugado sin escisión del grupo de unión, se inyecta en rata el conjugado correspondiente conjugado de manera permanente.

En la tabla 2, se tabulan los resultados de las determinaciones de la semivida *in vivo*.

Compuesto	Caracterización <i>in vitro</i> : semivida <i>in vitro</i> de conjugados permanentes
HGH nativa (hGH, Novo Nordisk, Dinamarca)	20 minutos
23	4 horas
25	5 horas
26	11 horas
27	13 horas

20 Tabla 2: Semivida de conjugados PEG-hGH permanentes en ratas

Conclusión:

A partir de la tabla 1 y la tabla 2, resulta obvio que la actividad residual se correlaciona de manera inversa con semivida, por ejemplo un alto grado de actividad residual provoca una eliminación más rápida. Esto es típico para conjugados eliminados mediante mecanismos de aclaramiento mediado por receptor.

25 Además, para obtener un profármaco pegilado de hGH que pueda administrarse una vez a la semana en seres humanos y con una baja actividad residual, se prefiere una molécula de PEG con uno o más puntos de ramificación y con un peso molecular de 40 kDa o menor. Alternativamente, la conjugación de PEG a más de un sitio en hGH para formar bisconjugados PEG-hGH da como resultado una semivida terminal larga.

30 **Ejemplo 27 Estudio farmacodinámico del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 y hormona de crecimiento humana en macacos cangrejeros**

El objetivo de este estudio era comparar la respuesta farmacodinámica en macacos cangrejeros de una dosis del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 con dosificación una vez al día de hormona de crecimiento humana durante una semana.

Se estudiaron los siguientes grupos de dosificación:

35

Artículo de prueba	Dosis	Vía de dosificación	Momento de la dosis
Hormona de crecimiento humana	0,3 mg/kg/día	s.c.	Días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36	5 mg/kg	s.c.	Día 1
Conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36	10 mg/kg	s.c.	Día 1
Vehículo (ácido succínico 10 mM, trehalosa 92 mg/ml, pH 4,0)	0 mg/kg	s.c.	Día 1

5 Puesto que el conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 se pegila de manera transitoria usando un grupo PEG de 80 kDa, las cantidades de hGH en los grupos de dosificación de 5 y 10 mg/kg de conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 fueron de aproximadamente 1 y 2 mg/kg, respectivamente. Así, la cantidad de hGH en el grupo de 10 mg/kg de conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 fue equivalente a una dosis diaria de 0,3 mg/kg de hGH.

Se inyectó cada artículo de prueba por vía subcutánea a 2 macacos cangrejeros (1 macho, 1 hembra) usando un volumen de dosis de 1 ml/kg. La edad y el peso de los animales fueron de 2,5-3 años y 2,0-2,5 kg, respectivamente.

10 Se tomaron muestras de sangre de la vena/arteria femoral para la determinación de concentraciones en suero de IGF-1, un marcador farmacodinámico para la hormona de crecimiento humana.

Se tomaron las muestras de sangre en los siguientes puntos de tiempo: 0 (antes de la dosis), 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de la dosificación en el día 1.

15 Se tomaron muestras de sangre, se permitió que coagulasen y se almacenaron en un bloque de hielo o hielo fundente hasta que se centrifugaron. Después de la centrifugación, se tomaron alícuotas de las muestras de suero en viales etiquetados previamente y se taparon de manera hermética. Se almacenaron los viales a -70°C tras tomarse alícuotas en viales.

20 Se midieron los niveles de IGF-1 en las muestras de suero muestras usando el kit de ELISA para IGF-1 humano Quantikine (R&D Systems) que se había adaptado y validado para su uso en la determinación de los niveles de IGF-1 en suero de macaco cangrejero.

25 En la figura 7 se muestra la respuesta farmacodinámica de los artículos de prueba. Tanto la administración diaria de hGH como una administración del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 aumentó los niveles de IGF-1 con respecto a los niveles medidos en el grupo de vehículo. Una administración de 5 mg/kg del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 fue equivalente a la administración diaria de hGH mientras que se mostró que una administración de 10 mg/kg del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 era superior a hGH diariamente. Esto indicó claramente que una dosis una vez a la semana del conjugado mPEG-grupo de unión-hGH con enlaces carbamato transitorio 36 era superior a una dosis diaria equivalente de hGH.

Abreviaturas:

30 DBU 1,3-diazabicyclo[5.4.0]undeceno

DCM diclorometano

DIEA diisopropiltilamina

DMAP dimetilamino-piridina

DMF N,N-dimetilformamida

	DMSO	dimetilsulfóxido
	eq.	equivalente estequiométrico
	fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	HFIP	hexafluoroisopropanol
5	HOSu	N-hidroxisuccinimida
	LCMS	espectrometría de masas-cromatografía de líquidos acoplada
	Mal	maleimidopropionilo
	EM	espectro de masas
	PM	peso molecular
10	PEG	polietilenglicol
	RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa
	R _f	factor de retención
	t.a.	temperatura ambiente
	SEC	cromatografía de exclusión molecular
15	Suc	succinimidopropionilo
	TES	trietsililano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	Trt	tritilo
20	Lista de bibliografía	
	1. Büyükgebiz A. <i>et al</i> / J. Pediatr. Endocrinol. Metab. Enero-febrero de 1999; 12(1):95-7	
	2. Clark <i>et al</i> , 1996, Journal of Biological Chemistry 271: 21969-21977	
	3. Girard, J. Mehls, O., J. Clin Invest. Marzo de 1994; 93(3): 1163-1171	
25	4. Philip Harris <i>et al</i> . Horm. Res. 2006; 65 (Supl. 4): 1-213, CF1-98 GH/IGF Treatment con el título "First in-human study of PEGylated recombinant human growth hormone".	
	5. Veronese, F.M. "Enzymes for Human Therapy: Surface Structure Modifications," <i>Chimica Oggi</i> , 7:53-56 (1989).	

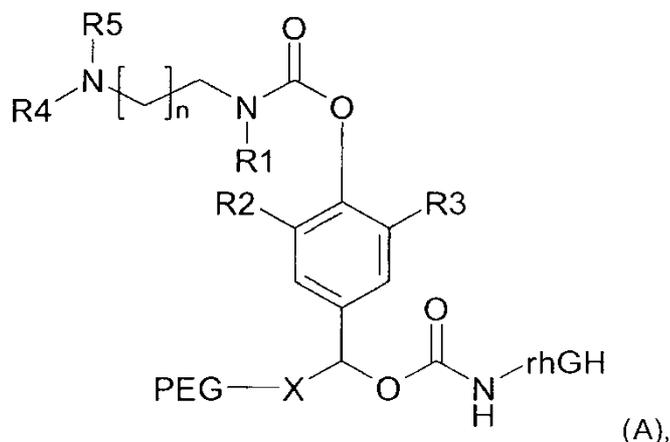
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende excipientes farmacéuticos adecuados y que comprende también una cantidad eficaz clínica *in vivo* en seres humanos de un conjugado de profármaco pegilado de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH), en la que PEG se une a rhGH mediante un grupo de unión transitorio autohidrolizable (autoescindible); estando dicho conjugado de profármaco caracterizado porque:

(1): el conjugado tiene una actividad GH que es menor del 5% de la hormona de crecimiento nativa sin PEG; y

(2): la velocidad de autohidrólisis de grupo de unión es tal que la semivida *in vivo* es de desde 10 horas hasta 600 horas que se mide mediante inyección intravenosa en ratas del conjugado, seguido por la extracción de muestras de sangre a intervalos de tiempo, preparación de plasma y análisis de hGH usando ELISA; y

10 en la que el conjugado de profármaco pegilado tiene la estructura química (A):



en la que

HN-rhGH representa el residuo de rhGH unido al grupo de unión transitorio;

15 R1, R2, R3, R4, y R5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo;

PEG representa el residuo de pegilación unido al grupo de unión transitorio;

n = 1 ó 2; y

X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12; y

en la que el PEG es ramificado y contiene al menos 3 cadenas.

20 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la velocidad de autohidrólisis es tal que la semivida *in vivo* es hasta 5 veces más corta que la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente.

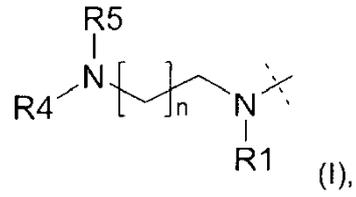
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que la semivida *in vivo* es hasta 3 veces más corta que la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente.

25 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, en la que la semivida *in vivo* es hasta 2 veces más corta que o casi idéntica a la semivida *in vitro* del conjugado de profármaco pegilado de hGH correspondiente.

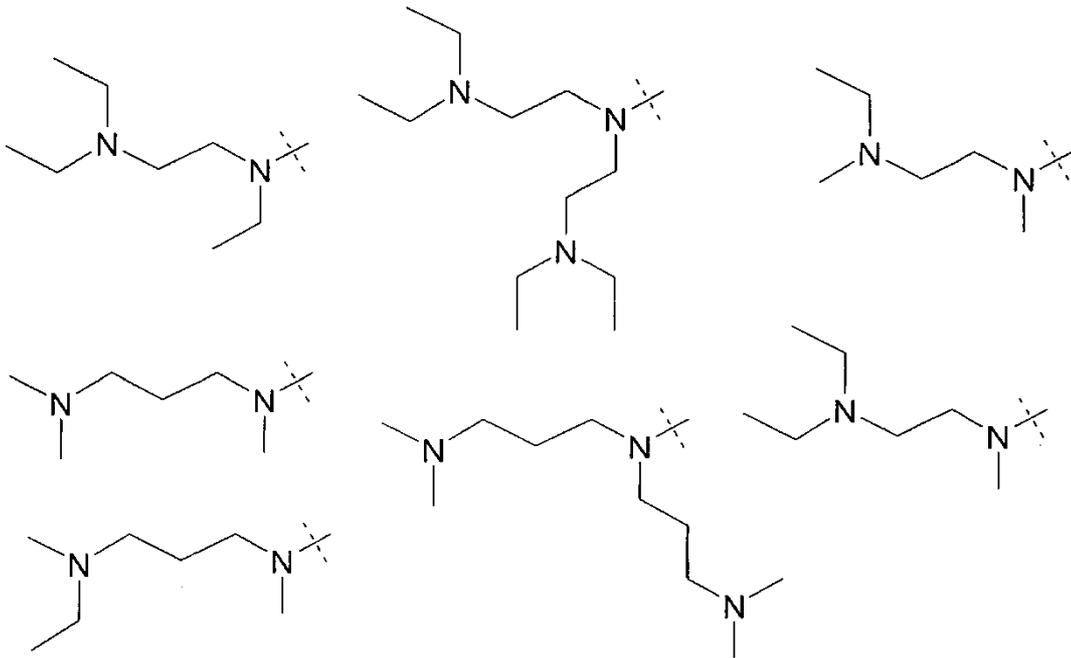
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es una composición para administración subcutánea, administración intramuscular o inyección intravenosa.

30 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el profármaco pegilado tiene una carga de PEG total por molécula de hormona de crecimiento que asciende a al menos 25 kDa.

7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la estructura parcial de fórmula (I) dentro de la estructura (A) según la reivindicación 1, que es

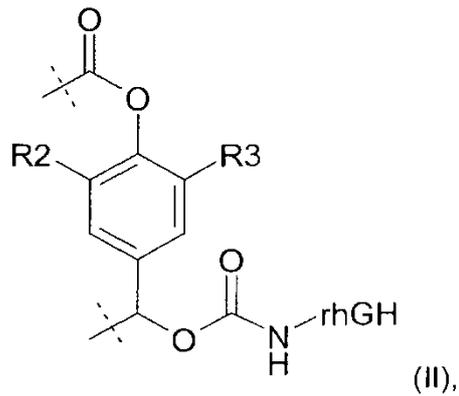


se selecciona del grupo que consiste en:

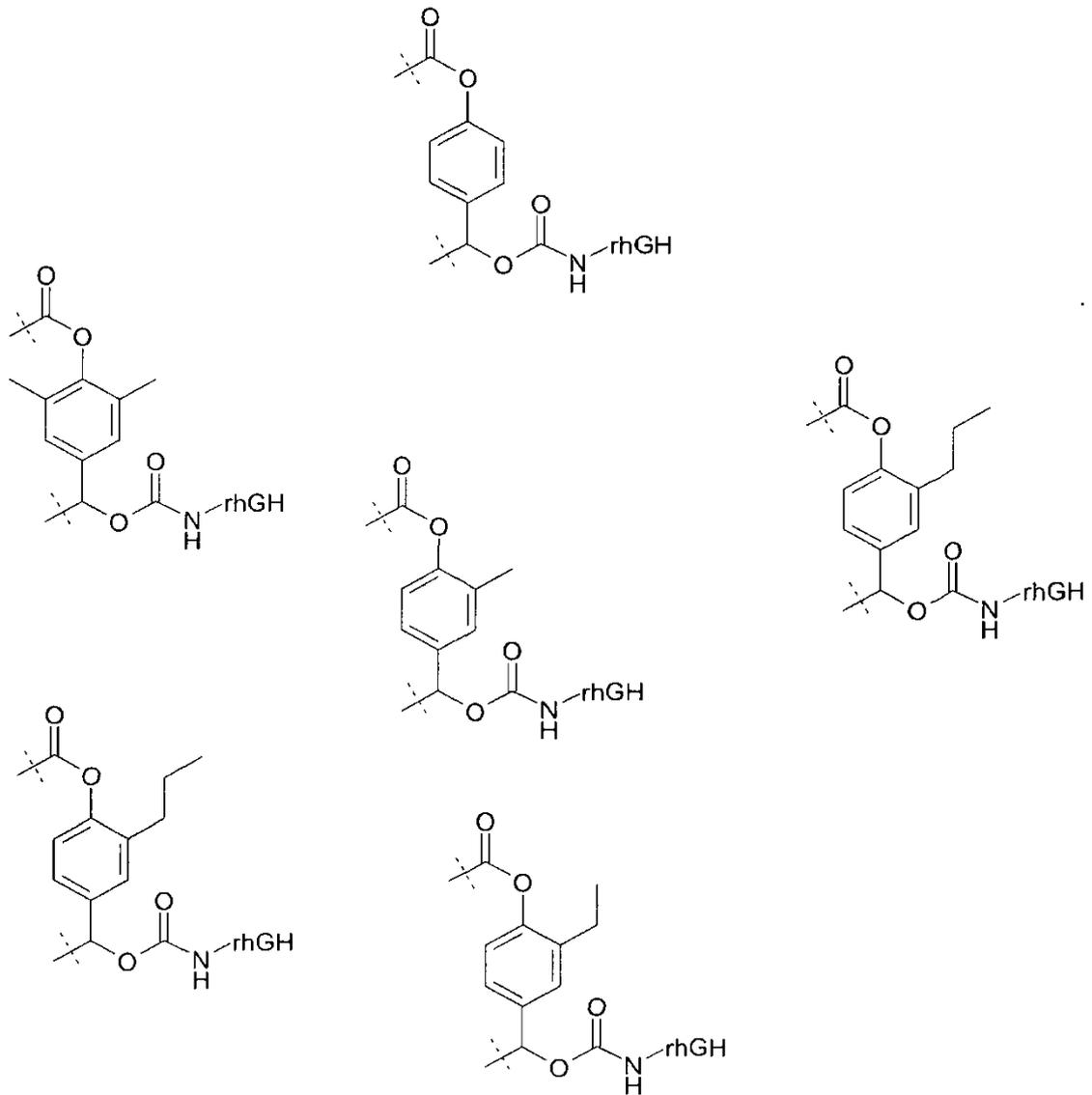


5

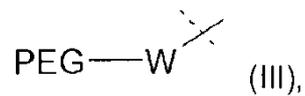
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la estructura parcial de fórmula (II) dentro de la estructura (A) según la reivindicación 1, que es



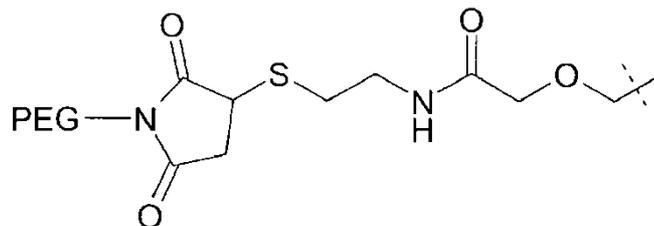
se selecciona del grupo que consiste en:

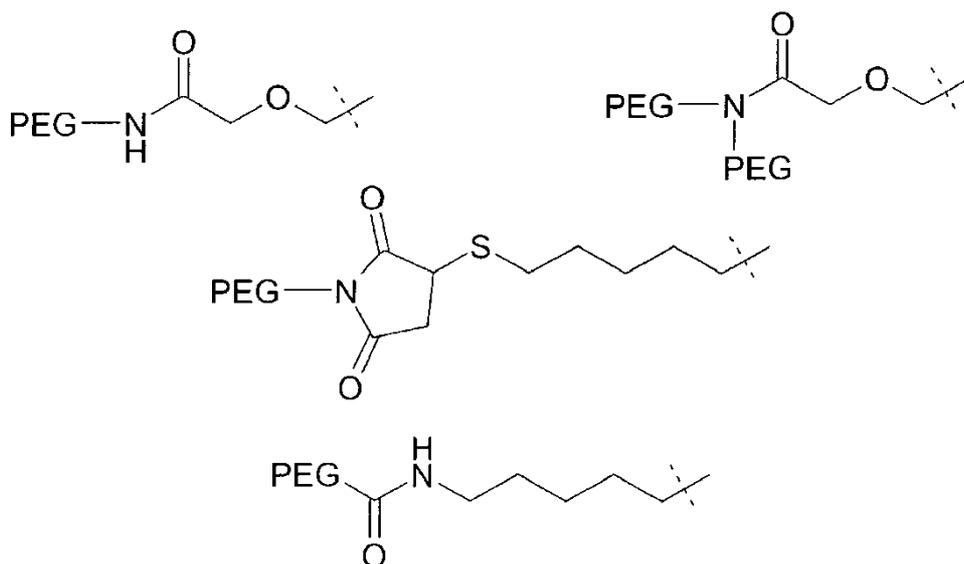


9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que PEG-X en la fórmula (A) según la reivindicación 1 es PEG-W de fórmula III:

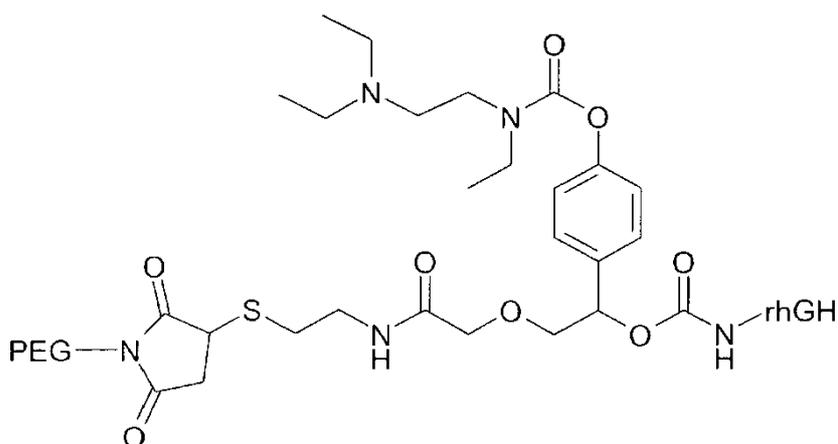


5 en la que PEG-W se selecciona del grupo que consiste en:





5 10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la estructura del conjugado de profármaco es:



11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la velocidad de autoescisión de grupo de unión *in vivo* es tal que la semivida *in vivo* es de desde 20 hasta 300 horas.

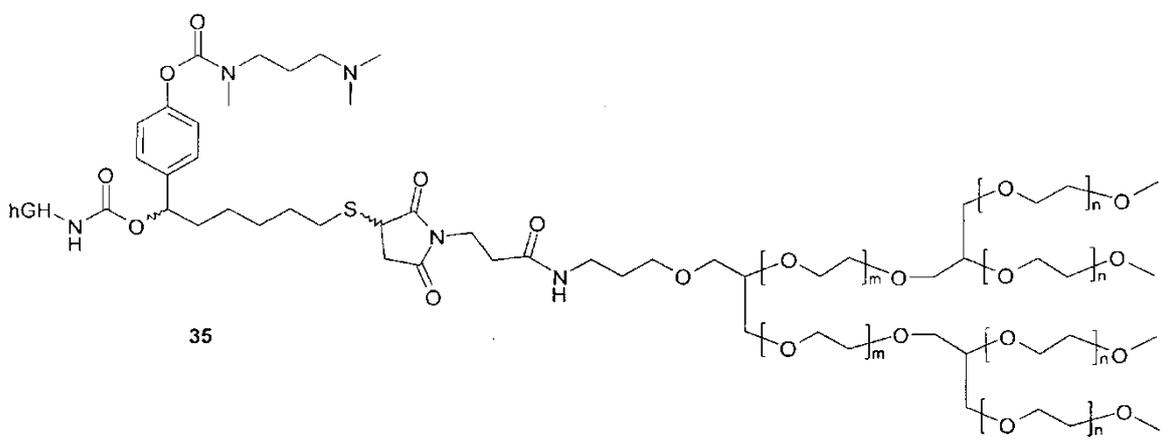
10 12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la velocidad de autoescisión de grupo de unión *in vivo* es tal que la semivida *in vivo* es de desde 20 hasta 150 horas.

13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la velocidad de autoescisión de grupo de unión *in vivo* es tal que la semivida *in vivo* es de desde 30 hasta 100 horas.

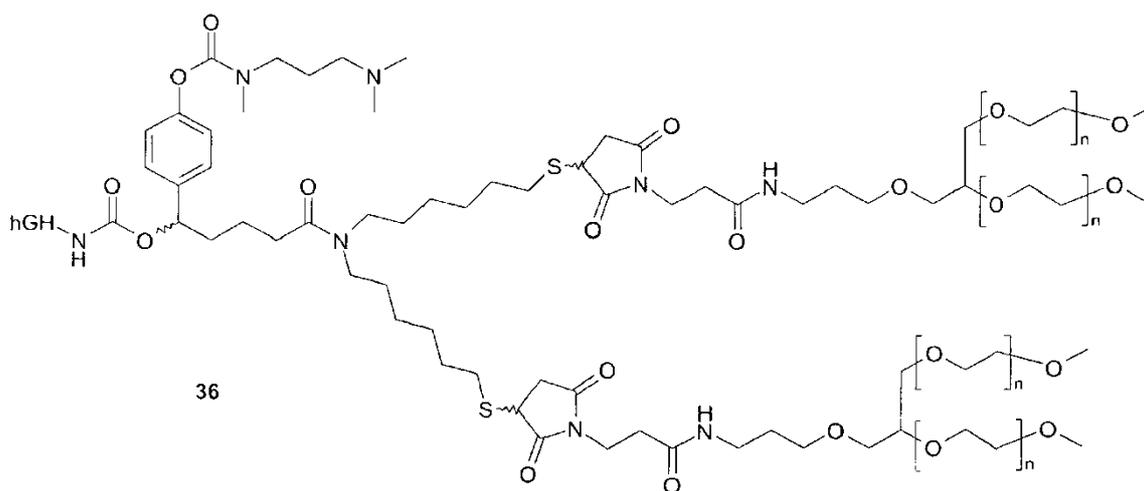
14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la velocidad de autoescisión de grupo de unión *in vivo* es tal que la semivida *in vivo* es de desde 30 hasta 75 horas.

15 15. Cantidad eficaz clínica de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad relacionada con GH en una persona, en la que dicha enfermedad se selecciona de deficiencia de hormona de crecimiento, deficiencia de hormona de crecimiento de inicio en la edad adulta; síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi; síndrome del intestino corto; insuficiencia renal crónica; pequeño para la edad gestacional (SGA); emaciación debida al SIDA; antienvjecimiento; artritis reumatoide; talla baja idiopática; gen de caja homeo de talla baja; somatopausia; síndrome de Noonan; displasia esquelética; síndrome de Down; talla baja asociada con el uso prolongado de esteroides; síndrome de Aarskog; enfermedad renal crónica; artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística; infección por VIH en niños que reciben tratamiento de TARGA; talla baja en niños nacidos con un peso al nacer muy bajo pero SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; talla baja idiopática; DHC en adultos; fractura en o de huesos largos; fracturas en o de huesos esponjosos; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos; osteogénesis por distracción;

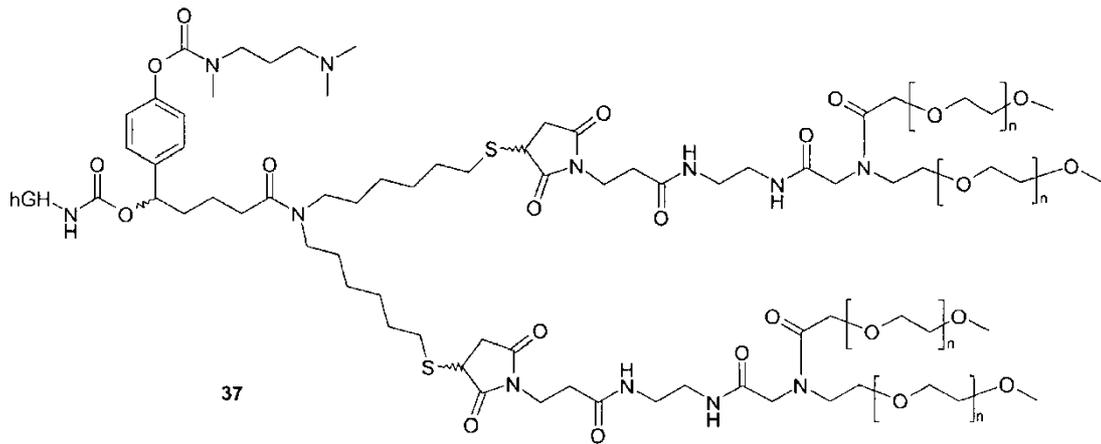
- 5 trastornos que resultan de artroplastia de cadera o de discos, reparación de menisco, fijación de prótesis o artrodesis
 10 vertebrales; trastornos que resultan de la fijación de material de osteosíntesis; pseudoarticulación o consolidación
 defectuosa de fracturas; trastornos que resultan de osteatomía; trastornos que resultan de la implantación de
 injertos; degeneración de cartílago articular en la rodilla provocada por traumatismo o artritis; osteoporosis en
 pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (PADC);
 enfermedad cardiovascular asociada con desnutrición en PADC; reversión de caquexia en PADC; cáncer en PADC;
 enfermedad pulmonar obstructiva crónica en PADC; VIH en PADC; ancianos con PADC; enfermedad hepática
 crónica en PADC; síndrome de fatiga en PADC; enfermedad de Crohn; insuficiencia hepática; hombres con infección
 por VIH; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a VIH; esterilidad
 masculina; pacientes después de cirugía mayor programada, deshabituación de alcohol o drogas, traumatismo
 neurológico; envejecimiento; ancianos frágiles; osteoartritis; cartílago dañado de manera traumática; disfunción
 eréctil; fibromialgia; trastornos de la memoria; depresión; traumatismo craneoencefálico; hemorragia subaracnoidea;
 un peso al nacer muy bajo; síndrome metabólico; miopatía por glucocorticoides; y talla baja debida a tratamiento con
 glucocorticoides en niños.
- 15 16. Profármaco seleccionado del grupo que consiste en



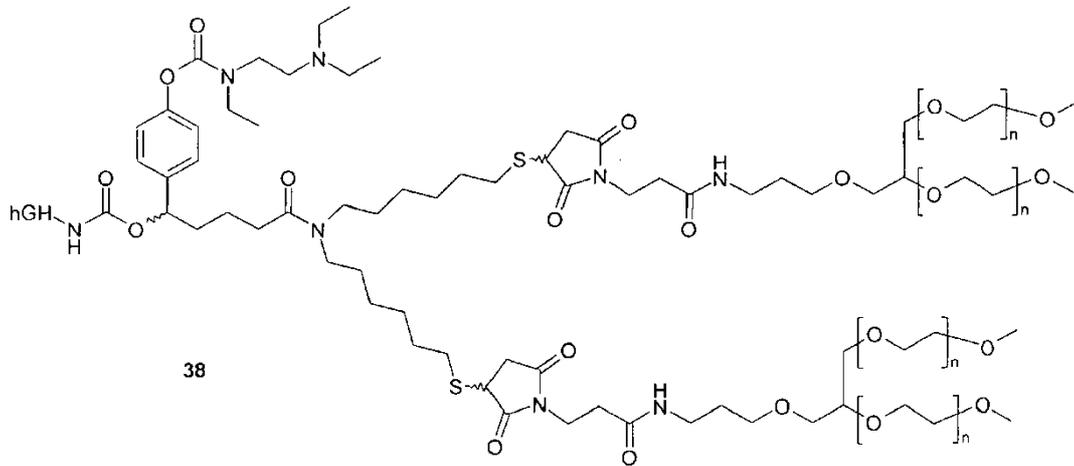
en la que m es un número entero desde 200 hasta 250 y n es un número entero desde 100 hasta 125;



en la que n es un número entero desde 400 hasta 500;



en la que n es un número entero desde 400 hasta 500; y



en la que n es un número entero desde 400 hasta 500.

Fig. 1

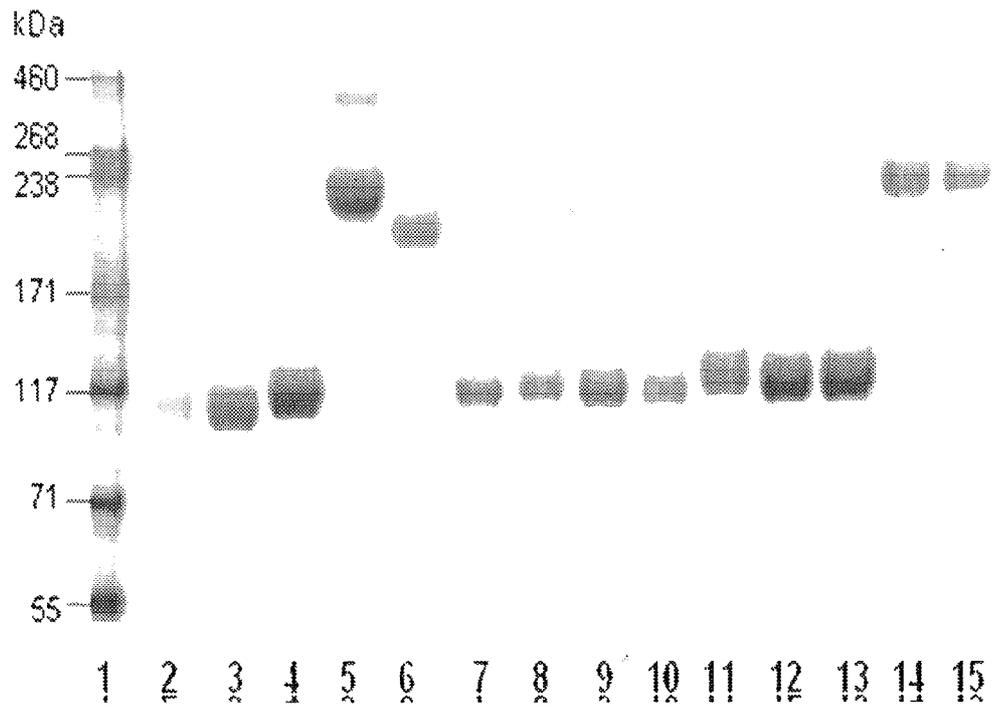


Fig. 2

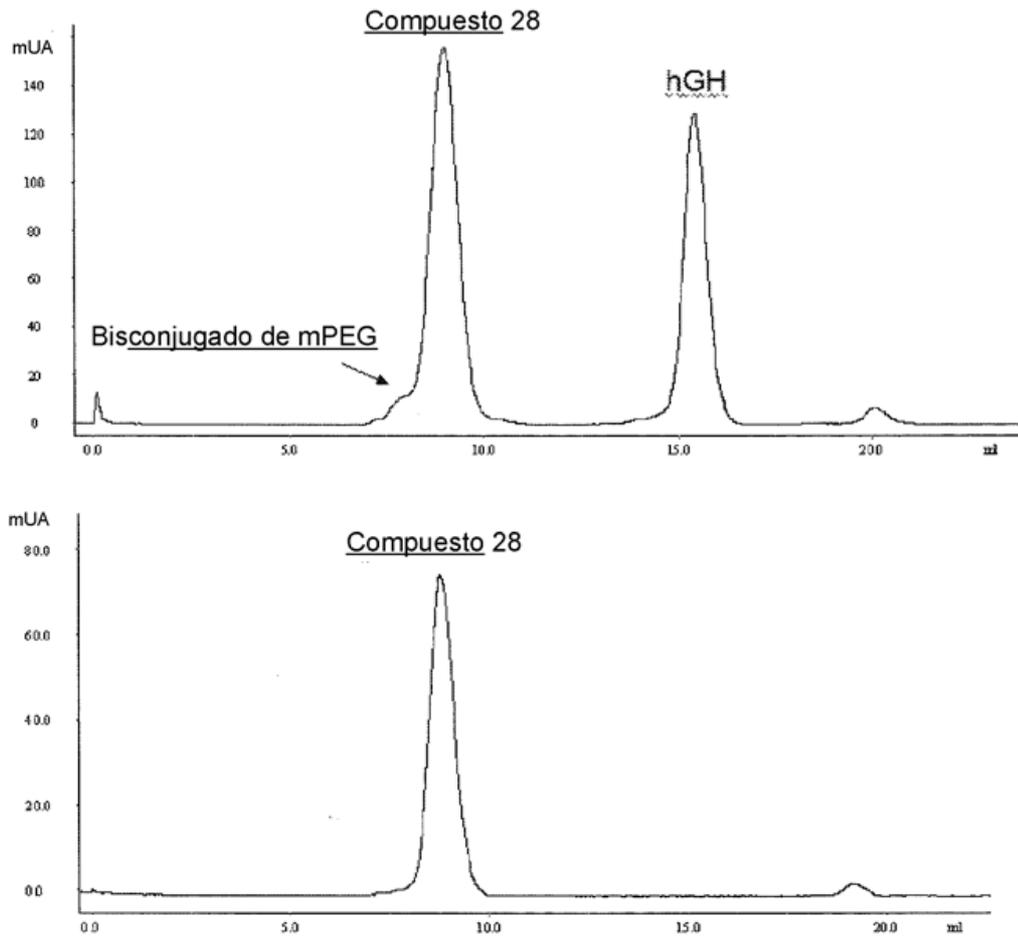


Fig. 3

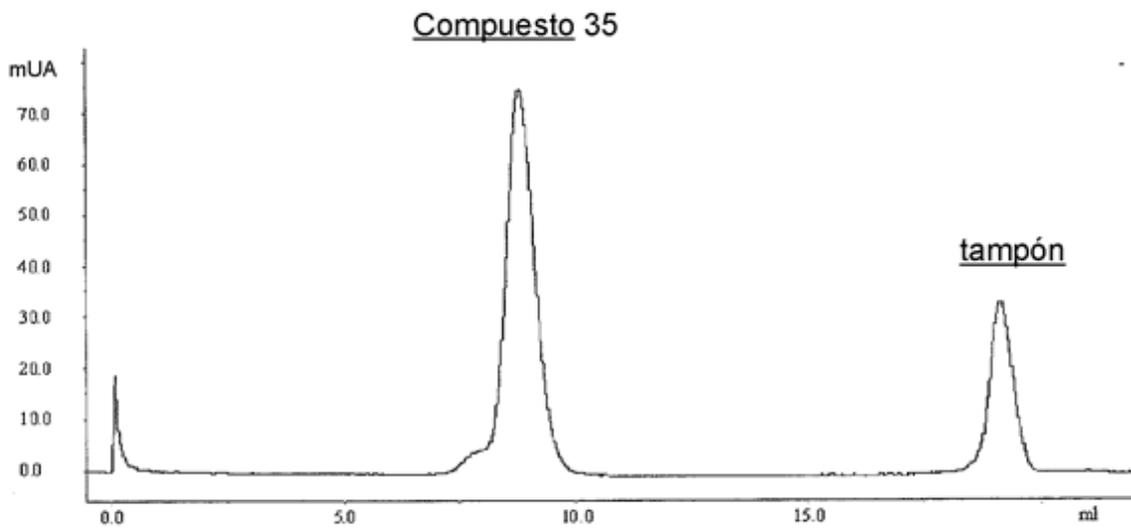
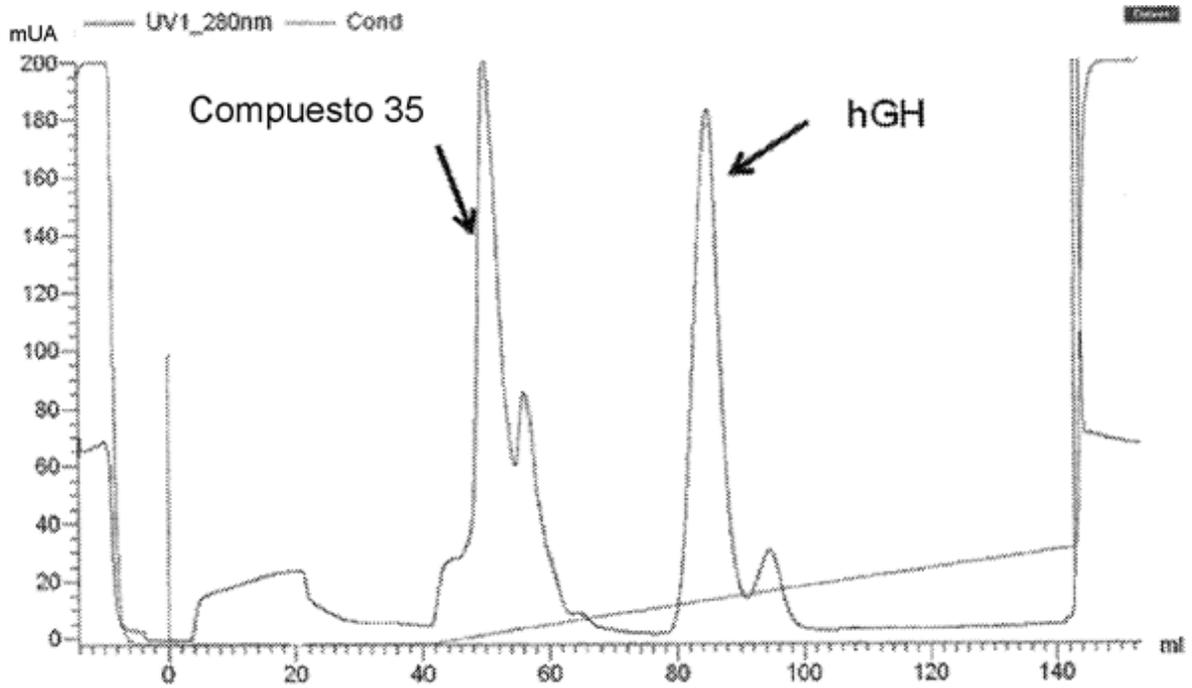


Fig. 4

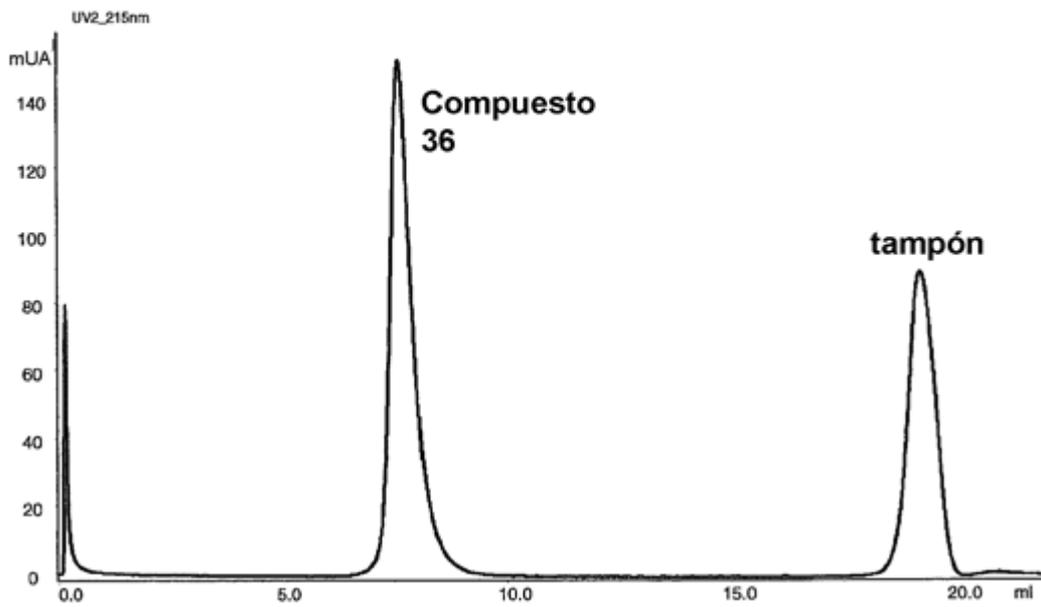
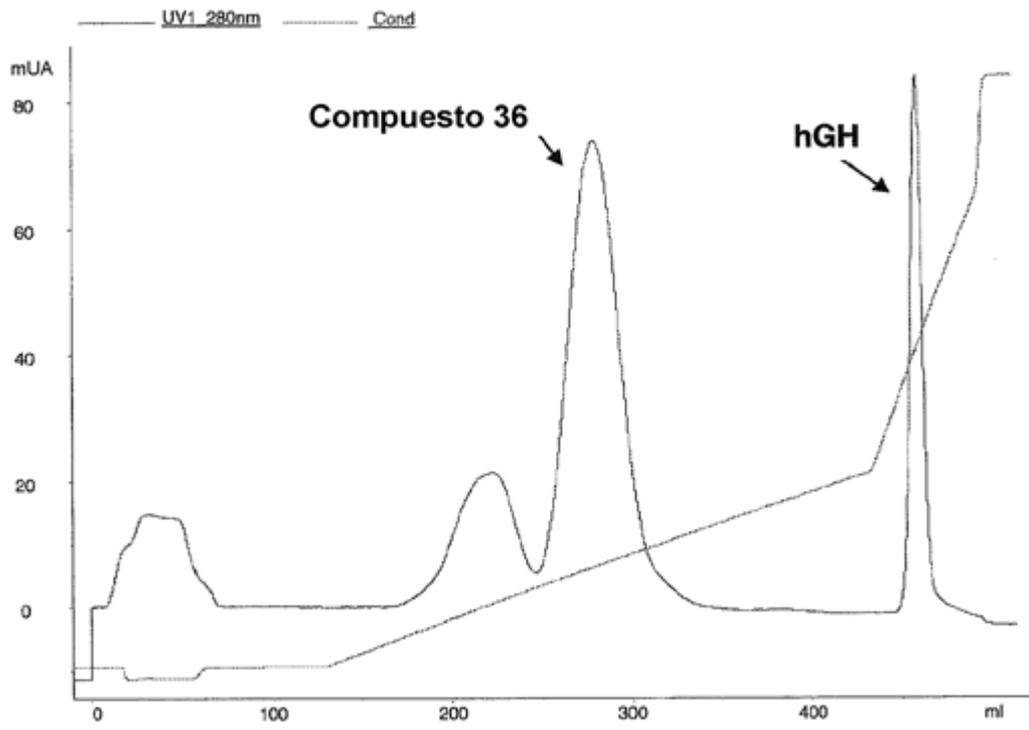


Fig. 5

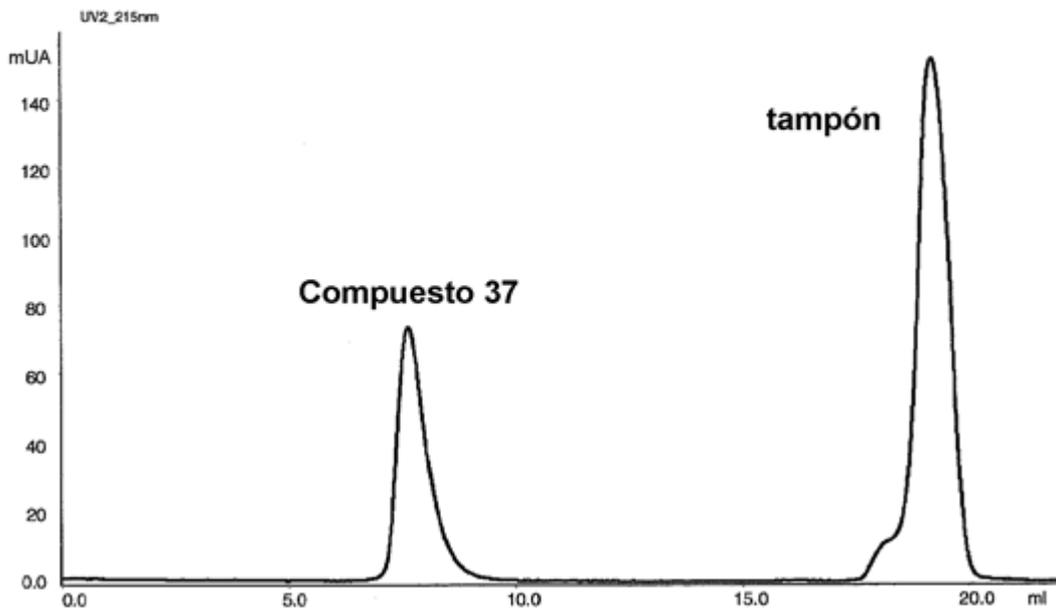
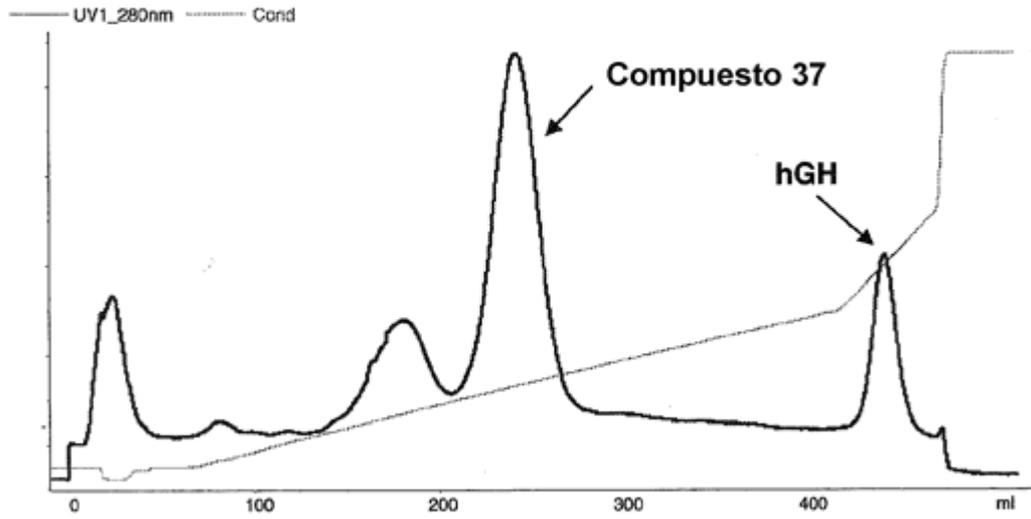


Fig. 6

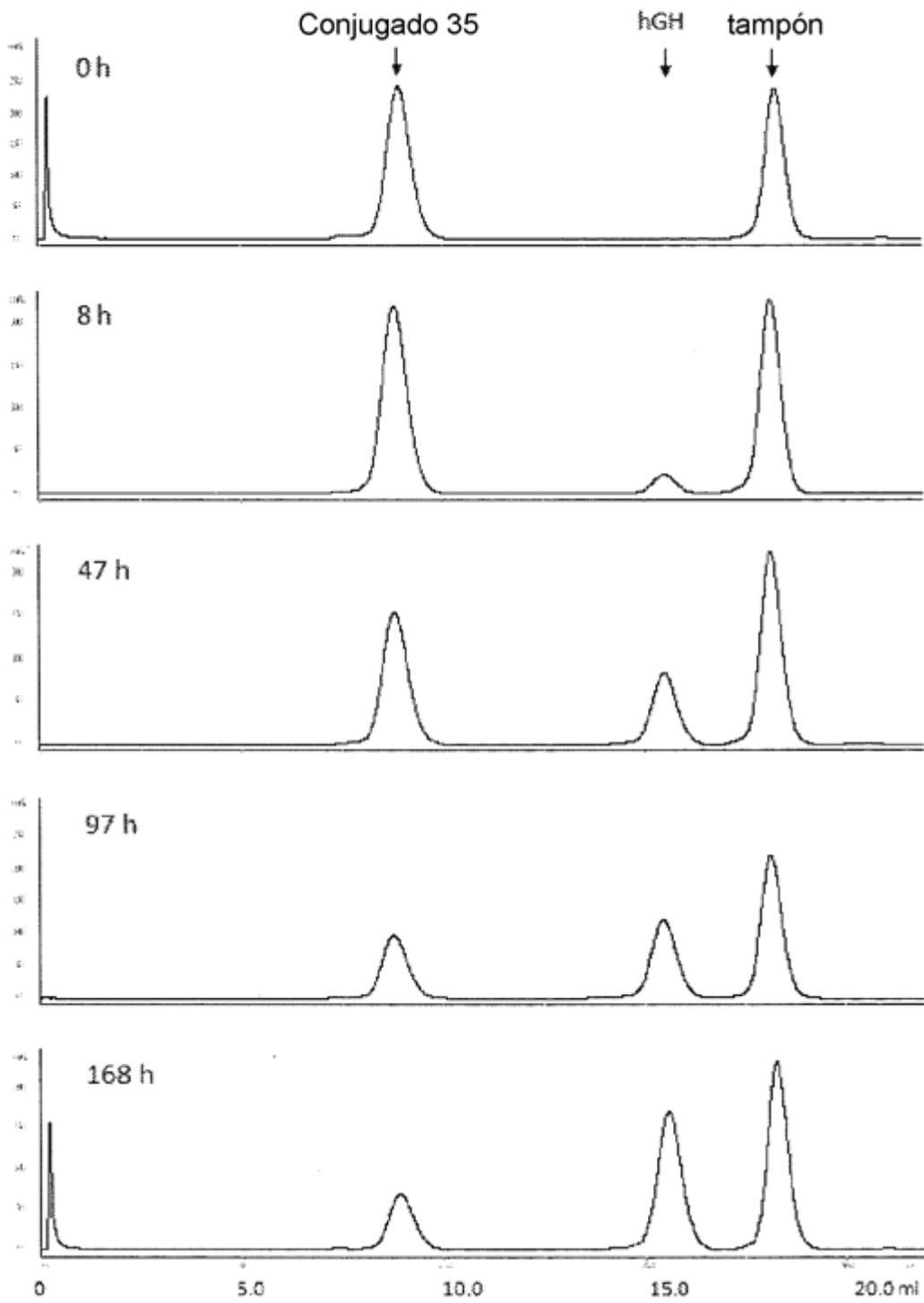


Fig. 7

