

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 025**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/EP2010/069710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10790843 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2512450**

54 Título: **Composición seca de hormona de crecimiento unida transitoriamente a un portador de polímero**

30 Prioridad:

15.12.2009 EP 09179335

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

09.05.2018

73 Titular/es:

**ASCENDIS PHARMA ENDOCRINOLOGY
DIVISION A/S (100.0%)
Tuborg Boulevard 5
2900 Hellerup, DK**

72 Inventor/es:

**RASMUSSEN, GRETHE, NØRSKOV;
KINDERMANN, SUSANNE;
RAU, HARALD y
WEGGE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 667 025 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

Composición seca de hormona de crecimiento unida transitoriamente a un portador de polímero

La presente invención se refiere a composiciones de profármacos de polímero de rhGH y a métodos para su fabricación. La hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés) 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 adenohipófisis. La hormona también se conoce como somatotropina cuando se hace referencia a la hormona de crecimiento humana (hGH, por sus siglas en inglés) producida mediante tecnología de ADN recombinante, y se abrevia como "rhGH". La hormona de crecimiento tiene una variedad de funciones en el cuerpo, de las cuales la más notoria es el aumento de la altura durante toda la infancia, y existen varias enfermedades que pueden ser tratadas por medio del uso terapéutico de GH. La deficiencia de la hormona de crecimiento es causada por la producción insuficiente de la hormona de crecimiento, lo que causa varios efectos negativos. Durante el primer año de vida y la infancia, la característica más destacada es la falta de crecimiento, lo que resulta en una baja estatura, mientras que en adultos causa disminución de la masa corporal magra, baja densidad ósea y otros efectos físicos y psicológicos. El tratamiento estándar de la deficiencia de la hormona de crecimiento son las inyecciones diarias con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) bajo la piel o dentro del músculo. Para liberar al grupo de pacientes pediátricos de la carga de las inyecciones diarias, las composiciones de hormona de crecimiento de acción prolongada están destinadas a proporcionar tratamiento para la deficiencia de la hormona de crecimiento en niños. Se describen varias composiciones de hormona de crecimiento humana de acción prolongada o de liberación sostenida. Los depósitos de hormona de crecimiento de la primera generación se basaban en composiciones de liberación lenta de la hormona de crecimiento humana en un líquido altamente viscoso tal como acetato isobutirato de sacarosa (documento WO 01/78683, Genentech) o gel de PLGA (polilactida/poliglicolida) biodegradable. El documento US 5.645.010, Alkermes, describe una composición de hGH complejada con zinc en PLGA. El producto comercializado correspondiente (Nutropin Depot) se ofertó como composición inyectable de dosis única. Por varias razones, Nutropin Depot no mostró una aceptación significativa del mercado y se dejó de fabricar.

Composiciones a base de polímero más recientes emplearon ácido hialurónico en lugar de PLGA (documento US 2008/0063727, LG Life Sciences). Otros avances se centraron en los conjugados de PEG de la hormona de crecimiento con el objetivo de extender tanto la fase de absorción del tejido subcutáneo después de la inyección como la semivida terminal del conjugado circulante (el documento US 4.179.337 describe la PEGilación de somatotropina, al igual que el documento WO 03/044056, Pharmacia, y el documento WO 06/102659, Nektar).

Sin embargo, solamente pocos detalles sobre cómo formular la hormona de crecimiento PEGilada están disponibles. Como PEG en sí mismo es un material altamente viscoso, los correspondientes conjugados proteicos que portan cadenas de PEG de alto peso molecular también exhiben una viscosidad muy aumentada en comparación con la proteína no modificada. Esta situación es aún más pronunciada toda vez que se desea proporcionar suficiente material para una dosificación menos frecuente que la diaria, mientras que al mismo tiempo se busca minimizar el volumen de inyección. En consecuencia, las composiciones de la hormona de crecimiento PEGilada de acción prolongada son mucho más concentradas y viscosas que las composiciones existentes de una vez al día de la hormona de crecimiento no modificada.

El documento WO 2006/071840, Ambrx, detalla composiciones de variantes de hormona de crecimiento PEGilada que incorporan aminoácidos no naturales. El documento WO 2007/025988, Novo, describe composiciones que contienen hormona de crecimiento y PEG a través de un enlace de oxima. El documento US 26/257479, Novo, detalla composiciones de conjugados de la hormona de crecimiento PEG en PLGA. Recientemente se introdujo una expansión del alcance de la PEGilación mediante el uso de enlazadores reversibles en un enfoque de profármaco. Un profármaco PEGilado de hGH exhibe una bioactividad significativamente reducida del conjugado PEGilado, pero exhibe una bioactividad completa no comprometida de la hormona de crecimiento libre liberada del conjugado.

Las composiciones de tales profármacos de hGH no solo tienen que tener en cuenta la viscosidad introducida por el componente de PEG, sino que también deben proporcionar una estabilidad del profármaco suficiente para evitar la liberación prematura de hGH durante el almacenamiento. En caso de que el enlace reversible entre el resto de PEG y el fármaco se degrade durante el almacenamiento, aumenta la concentración de fármaco fácilmente disponible, lo que conlleva el riesgo de sobredosificación. Además, cualquier fármaco liberado durante el almacenamiento está sujeto a aclaramiento renal rápido tras la aplicación al paciente y, como consecuencia, se reduce el tiempo durante el cual la composición de acción prolongada proporciona cantidades terapéuticamente relevantes de fármaco. Esto plantea el riesgo de necesidades médicas no cubiertas.

Además, se sabe que la rhGH experimentará reacciones de descomposición en condiciones de almacenamiento, dando lugar a impurezas de la composición correspondiente. Por lo tanto, es obligatorio identificar composiciones de profármacos de polímero de rhGH adecuadas, en las que la rhGH exhiba un perfil de impurezas aceptable. Por lo tanto, es de interés primordial desarrollar composiciones de profármacos de polímero de hGH que aseguren la estabilidad del compuesto de profármaco de polímero de rhGH. Además, es deseable proporcionar composiciones

de dosis única, así como de dosis múltiples, de tales profármacos de polímero de hGH.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones de acuerdo con las reivindicaciones 1-20. El objeto se logra mediante una composición seca que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH y uno o más lioprotectores y, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en la que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero. En el contexto de la presente invención, los términos y las frases se usan de la siguiente manera. Dado que la GH humana recombinante es idéntica en secuencia a la GH humana natural, la expresión hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) se refiere en el presente documento también a los denominados equivalentes biogénicos. Por lo tanto, los términos rhGH y hGH se pueden usar como sinónimos dentro del significado de la presente invención. Tal como conoce el experto en la materia, 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 a la actividad del producto biológico. Además de productos biogénicos y humanos recombinantes, la expresión hormona de crecimiento humana recombinante también se refiere en el presente documento a todos los posibles polipéptidos de rhGH. 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. La expresión "polipéptido de hGH o proteína de hGH", cuando se usa en el presente documento, engloba todos los polipéptidos de hGH, preferiblemente de especies de mamíferos, más preferiblemente de ser humano y de especies murinas, 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. Opcionalmente, la expresión "polipéptido de hGH o proteína de hGH" incluye además hGH con uno o más residuos de aminoácidos adicionales en comparación con las variantes de hGH que se producen de manera natural, mientras que estos residuos de aminoácidos adicionales pueden estar en el extremo N, el extremo C y/o internamente. Se entiende que la expresión "polipéptido hGH o proteína de hGH" también se refiere a variantes de hGH con cualquier combinación de residuos de aminoácidos adicionales, deletionados o sustituidos.

Preferiblemente, la expresión "polipéptido de hGH o proteína de hGH", cuando se usa en el presente documento, incluye todos los polipéptidos de hGH, preferiblemente de especies de mamíferos, más preferiblemente de ser humano y de especies murinas, 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.

Más preferiblemente, el polipéptido de hGH o la proteína de hGH es al menos un 95 % idéntica a la secuencia que usa el código de 1 letra para aminoácidos de acuerdo con IUPAC-IUB conocido por el experto en la materia, que se proporciona a continuación:

**FPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPT
PSNREETQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNLSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG
IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQYTSKFDNNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV
QCRSVEGSCGF**

La expresión "polipéptido o proteína de hGH" se refiere preferiblemente al polipéptido de hGH de 22 kDa que tiene una secuencia tal como se desvela en A. L. Grigorian *et al.*, Protein Science (2005), 14, 902-913, así como sus variantes, homólogos y derivados que exhiben 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, la expresión "polipéptido o proteína de hGH" se refiere al polipéptido que tiene exactamente la secuencia mencionada anteriormente.

La expresión "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. En general, las diferencias son limitadas, de modo que las secuencias de aminoácidos de la referencia y la variante son muy similares de manera global y, en muchas regiones, idénticas. Preferiblemente, los polipéptidos de hGH son al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos 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. Mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" 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 hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales,

intercaladas 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 una secuencia de aminoácidos completa de la secuencia de referencia o cualquier fragmento especificado tal como se describe en el presente documento.

- 5 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 empalme que se producen de manera natural que se originan a partir de un solo transcrito primario. Como alternativa, una variante de polipéptido de hGH puede ser una variante que no se sabe que se produce de manera natural y que puede prepararse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.
- 10 Se sabe en la técnica que uno o más aminoácidos pueden delecionarse del extremo N o extremo C de una proteína o un péptido bioactivo sin pérdida sustancial de la función biológica (véase, por ejemplo, Ron *et al.*, (1993), *Biol Chem.*, 268 2984-2988, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).
- 15 También se reconocerá por un experto habitual en la materia 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, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad, en el que los autores indican que existen dos enfoques principales para estudiar la tolerancia al cambio de una secuencia de aminoácidos.
- 20 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 cribados 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, qué cambios de aminoácidos es probable que sean permisivos en una determinada posición de la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos más profundos requieren cadenas laterales no polares, mientras que, en general, 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 el presente documento.
- 25 Normalmente se consideran sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Phe, el intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr, el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y los 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.
- 30 La expresión polipéptido de hGH también engloba todos los polipéptidos de hGH codificados por análogos, ortólogos y/u homólogos de especie de hGH. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "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 hubieran tenido 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, la expresión "ortólogos de hGH" se refiere a hGH dentro de dos especies diferentes cuyas secuencias están relacionadas entre sí mediante una hGH
- 35 homóloga común en una especie ancestral, pero que han evolucionado para diferenciarse entre sí. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "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.
- 40
- 45
- 50
- 55 Por lo 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 estar 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 un péptido de la región de fusión IgG Fc o una secuencia secretora o líder o una secuencia que se emplea para la purificación de la forma anterior del polipéptido o una secuencia de pro-proteína.

5 Los polipéptidos de hGH pueden ser monómeros o multímeros. Los multímeros pueden 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 están entre las secuencias heterólogas contenidas en una

10 proteína de fusión que contiene un polipéptido de hGH o un fragmento del mismo (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.478.925, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). En otro ejemplo, un polipéptido de hGH o un 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 enlazadores peptídicos, tales como los descritos en el documento US 5.073.627. Otro método para preparar polipéptidos de hGH multímeros

15 implica el uso de polipéptidos de hGH fusionados a una secuencia de polipéptido de cremallera de leucina o de 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 materia, incluyendo las enseñanzas del documento WO 94/10308. En otro ejemplo, pueden asociarse polipéptidos de hGH mediante interacciones entre la secuencia de polipéptido Flag®

20 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, tales como entrecruzamiento usando moléculas enlazadoras y técnicas de optimización de la longitud de moléculas enlazadoras 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

25 5.478.925, adición de cisteína o biotina al extremo C o extremo N 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 de Estados Unidos número 5.478.925), cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en sus totalidades. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "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, es decir, se refiere a polipéptidos de hGH que tienen una o más deleciones de al menos un residuo de aminoácido en el extremo N, extremo C y/o internamente, en comparación con las variantes que se producen de manera natural.

Es bien sabido que rhGH o sus variantes, conjugados o derivados pueden experimentar reacciones de descomposición que pueden conducir a impurezas, tales como:

- Productos de degradación de succinimida e isoaspartato (impurezas): la formación de enlaces peptídicos de isoaspartato es una de las formas más comunes de degradación no enzimática de péptidos y proteínas en condiciones poco rigurosas. Para hGH, el sitio primario de formación de succinimida y la posterior hidrólisis a isoaspartato y aspartato es ASP130.
- 40 • Productos de degradación (impurezas) resultantes de la desamidación: en condiciones poco rigurosas, los sitios primarios de desamidación de hGH son ASN149 y ASN152.
- Productos de degradación (impurezas) resultantes de la oxidación: en condiciones poco rigurosas, el sitio primario de oxidación de hGH es MET14.

Para mejorar las propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas de un fármaco, tal como rhGH, *in vivo*, dicho fármaco se puede conjugar con un portador. Si el fármaco está unido transitoriamente a un portador y/o un enlazador, tales sistemas se asignan comúnmente como profármacos unidos a portador. Según las definiciones de la IUPAC (tal como se proporcionan en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem>, al que se accedió el 22 de julio de 2009), un profármaco unido a portador es un profármaco que contiene un enlace temporal de un principio activo dado con un grupo portador transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que

50 puede retirarse fácilmente *in vivo*, habitualmente mediante una escisión hidrolítica.

Los enlazadores empleados en tales profármacos unidos a portador son transitorios, lo que significa que son degradables (escindibles) hidrolíticamente, no enzimáticamente, en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37 °C) con semividas que varían desde, por ejemplo, una hora a tres meses. Los términos "transitorio" y "reversible" se utilizan como sinónimos.

55 Para el experto en la materia es evidente que los profármacos de polímero de hGH son conjugados covalentes, lo que significa que el resto de hGH se une covalentemente al polímero a través del resto del enlazador reversible.

Preferiblemente, los enlazadores empleados en los profármacos de polímero de hGH no tienen trazas, lo que significa que liberan hGH en su forma libre. Los portadores adecuados son polímeros y pueden conjugarse directamente con el enlazador o por medio de un espaciador no escindible. La expresión "profármaco de polímero de

hGH" se refiere a profármacos unidos a portador de hGH, en los que el portador es un polímero. El término polímero describe una molécula que comprende unidades estructurales de repetición conectadas por enlaces químicos de una manera lineal, circular, ramificada, reticulada o dendrímica o una combinación de las mismas, que puede ser de origen sintético o biológico o una combinación de ambos. Generalmente, un polímero tiene un peso molecular de al menos 1 kDa.

El término "PEG" o la expresión "residuo de pegilación" se usa en el presente documento a modo de ejemplo para polímeros solubles en agua adecuados caracterizados por polímeros de polietilenglicol que contienen al menos 50 unidades en peso de óxido de etileno. "Composición" se refiere a una mezcla de dos o más sustancias químicas. Una composición farmacéutica comprende el resto farmacéuticamente activo, ya sea en su forma libre o como un profármaco, y excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. "Composición seca" significa que la composición del profármaco de polímero de hGH se proporciona en forma seca en un recipiente. Los métodos adecuados para el secado son el secado por pulverización y la liofilización (secado por congelación). Dicha composición seca del profármaco de polímero de hGH tiene un contenido de agua residual de un máximo del 10 %, preferiblemente menos del 5 % y más preferiblemente menos del 2 % (determinado de acuerdo con Karl Fischer). El método preferido de secado es la liofilización. "Composición liofilizada" significa que la composición del profármaco de polímero de hGH se congeló primero, y posteriormente se sometió a reducción de agua por medio de presión reducida. Esta terminología no excluye etapas de secado adicionales que se producen en el proceso de fabricación antes de llenar la composición en el recipiente final. La "liofilización" (secado por congelación) es un proceso de deshidratación, caracterizado por congelar una composición y luego reducir la presión circundante y, opcionalmente, agregar calor para permitir que el agua congelada en la composición se sublime directamente de la fase sólida a gas. Normalmente, el agua sublimada se recoge por desublimación. "Reconstitución" significa la adición de un líquido para recuperar la forma original de una composición, tal como una solución. "Solución de reconstitución" se refiere al líquido usado para reconstituir la composición seca de un profármaco de polímero de rhGH antes de su administración a un paciente que lo necesite. "Recipiente" significa cualquier recipiente en el que esté comprendida la composición del profármaco de polímero de rhGH y que pueda almacenarse hasta la reconstitución.

"Estable" y "estabilidad" significa que, dentro del tiempo de almacenamiento indicado, los conjugados de polímero permanecen conjugados y no se hidrolizan de forma sustancial y exhiben un perfil de impurezas aceptable con relación a rhGH. Para que sea considerada estable, la composición contiene menos del 5 % del fármaco en su forma libre y cantidades bajas de impurezas relacionadas con rhGH, tales como la formación de succinimida e isoaspartato de ASP130, la desamidación de ASN140 y ASN152 y la oxidación de MET14. Las impurezas pueden cuantificarse como péptidos trípticos en base a su área de pico respectiva con respecto al área de pico del correspondiente péptido tríptico no modificado y "cantidades bajas" pueden corresponder a la existencia de tal impureza en un grado no superior al 20 %, preferiblemente no superior al 10 %, incluso más preferiblemente no superior al 5 % (por impureza).

"Forma libre" de un fármaco se refiere al fármaco en su forma no modificada, totalmente activa farmacológicamente, por ejemplo, después de ser liberado del conjugado de polímero.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y el estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y probando diferentes puntos en la matriz, lo que se encuentra dentro de las destrezas habituales de un médico cualificado. Dentro del alcance de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a dosificaciones que tienen como objetivo lograr un efecto terapéutico durante un período de tiempo prolongado, es decir, durante tres días o más, por ejemplo, una semana o dos semanas.

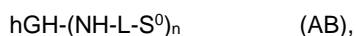
"Tampón" o "agente tamponante" se refiere a compuestos químicos que mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones fisiológicamente tolerados son, por ejemplo, fosfato de sodio, succinato, histidina, bicarbonato, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad de tamponamiento puede ajustarse para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

"Excipientes" se refiere a compuestos administrados junto con el agente terapéutico, por ejemplo, agentes tamponantes, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes anti-adsorción, agentes de protección contra la oxidación u otros agentes auxiliares. Sin embargo, en algunos casos, un excipiente puede tener funciones dobles o triples.

Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras el secado en general y especialmente durante la liofilización y el posterior almacenamiento. El lioprotector es trehalosa. El lioprotector se añade preferiblemente en una "cantidad lioprotectora" a la composición antes de la etapa de secado, lo que significa que, después de la

liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, la proteína esencialmente conserva su estabilidad e integridad física y química después de la liofilización y el almacenamiento. "Tensioactivo" se refiere a agentes humectantes que reducen la tensión superficial de un líquido. "Modificadores de la isotonicidad" se refieren a compuestos que minimizan el dolor que puede resultar del daño celular debido a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección. El término "estabilizantes" se refiere a los compuestos usados para estabilizar el profármaco de polímero. La estabilización se consigue mediante el refuerzo de las fuerzas estabilizadoras de la proteína, mediante la desestabilización del estado desnaturalizado o mediante la unión directa de excipientes a la proteína. "Agentes anti-adsorción" se refiere a tensioactivos principalmente iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles usados para recubrir o adsorberse competitivamente a la superficie interna del recipiente de la composición. La concentración elegida y el tipo de excipiente dependen del efecto a evitar, pero normalmente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfaz justo por encima del valor de CMC. "Agentes de protección contra la oxidación" se refiere a antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, glutatión, metionina, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafluorato, ácido tioglicólico. "Antimicrobiano" se refiere a una sustancia química que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras, protozoos y/o destruye virus. "Farmacéuticamente aceptable" se entiende que abarca cualquier excipiente y/o aditivo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. "Sellar un recipiente" significa que el recipiente se cierra de manera que sea hermético a aire, no permitiendo el intercambio de gases entre el exterior y el interior y manteniendo el contenido estéril.

Las composiciones de la divulgación contienen profármacos de polímero de rhGH. Preferiblemente, los profármacos de polímero de rhGH tienen la fórmula que se muestra en (AB)



en la que

n es 2, 3 o 4; preferiblemente 2;
 hGH(-NH)_n representa el residuo de hGH;
 cada L es un grupo funcional L^a, que es autohidrolizable (autoescindible) por un grupo inductor de autoescisión G^a; y
 cada S⁰ es independientemente una cadena de polímero que tiene un peso molecular de al menos 5 kDa, en la que S⁰ está opcionalmente ramificado al comprender al menos una primera estructura de ramificación BS¹, comprendiendo la primera estructura de ramificación BS¹ al menos una segunda cadena de polímero S¹ que tiene un peso molecular de al menos 4 kDa, en la que al menos uno de S⁰, BS¹, S¹ comprende además el grupo inductor de autoescisión G^a y en la que el peso molecular del conjugado de profármaco sin hGH-NH es al menos 25 kDa y como máximo 1000 kDa, preferiblemente al menos 25 kDa y como máximo 500 kDa, incluso más preferiblemente al menos 30 kDa y como máximo 250 kDa, incluso más preferiblemente al menos 30 kDa y como máximo 120 kDa, incluso más preferiblemente al menos 40 kDa y como máximo 100 kDa.

En una realización preferida, el polímero es PEG y la carga de PEG total por molécula de hormona de crecimiento asciende al menos a 25 kDa. Generalmente, la carga de PEG total será inferior a 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.

PEG puede fijarse 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. En caso de más de un punto de anclaje, tal como en un bisconjugado, el PEG correspondiente en el profármaco de hGH PEG puede ser ramificado o lineal. Los bisconjugados pueden contener PEG lineal o ramificado o pueden contener una mezcla de una cadena de PEG lineal y una ramificada. En caso de que se use una cadena de PEG ramificada, puede haber una o más unidades de ramificación.

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 fijación a la hormona de crecimiento. Esto podrían 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 lineal, ramificado o de múltiples brazos (por ejemplo, PEG en horquilla o PEG fijado a un núcleo de poliol), dendrítico o con enlazadores degradables.

- La PEGilación de GH humana nativa puede producirse en varios grupos lisina o en la amina N-terminal (F1) tal como se describe 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. Sin embargo, la PEGilación puede producirse en cualquier residuo de lisina de GH y/o en la amina N-terminal.
- Los profármacos de polímero de rhGH de las composiciones secas de la presente invención preferiblemente se PEGilan en una o más de las lisinas seleccionadas del grupo que consiste en Lys158, Lys145, Lys38, Lys140 y Lys70. Más preferiblemente, la PEGilación del resto de hGH se produce principalmente en las posiciones Lys158, Lys145, Lys38 y Lys140, incluso con más preferencia principalmente en las posiciones Lys158, Lys145 y Lys38.
- Preferiblemente, al menos el 30 % de todos los restos de hormona de crecimiento de la composición de la presente invención están PEGilados en la posición Lys158.
- En este contexto, la frase "PEGilación que se produce principalmente en la posición LysX" significa que al menos el 10 % de todos los restos de rhGH de los profármacos de polímero de rhGH están PEGilados en la posición aminoacídica X.
- En términos más generales, el PEG usado en el presente documento en combinación con un enlazador 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 lo tanto, el término PEG solo se usa en el presente documento a modo de ejemplo para polímeros adecuados.
- Por lo tanto, en una realización preferida, el profármaco de hGH PEG es un monoconjugado conjugado con uno de sus grupos amino primarios a un grupo funcional autoescindible L^a a una cadena de polímero S⁰. Esta cadena de polímero S⁰ tiene un peso molecular de al menos 5 kDa y comprende al menos una estructura de ramificación BS¹. La estructura de ramificación BS¹ comprende una segunda cadena de polímero S¹, que tiene un peso molecular de al menos 4 kDa.
- Tal como se describió anteriormente, se requiere que al menos una tercera cadena de polímero S² tenga un peso molecular de al menos 4 kDa. La cadena de polímero S² puede ser una parte de BS¹ o puede ser una ramificación adicional de S⁰ o S¹ dando como resultado una estructura de ramificación adicional BS², que comprende S².
- Opcionalmente, están presentes más de 3 cadenas de polímero en el conjugado de profármaco comprendido en las composiciones secas de la presente invención, por ejemplo, 4, 5, 6, 7 u 8. Sin embargo, cada cadena de polímero adicional tiene un peso molecular de al menos 4 kDa. El número total de cadenas de polímero está limitado por el peso total del conjugado de profármaco que es como máximo 1000 Da (sin hGH-NH).
- Por lo tanto, una realización preferida del profármaco de polímero de rhGH comprendido en la composición seca de la presente invención se refiere a un profármaco, en el que al menos una de las estructuras de ramificación BS¹, BS² comprende una cuarta cadena de polímero adicional S³ que tiene un peso molecular de al menos 4 kDa o uno de S⁰, S¹, S² comprende una tercera estructura de ramificación BS³ que comprende la al menos cuarta cadena de polímero S³ que tiene un peso molecular de al menos 4 kDa.
- El grupo inductor de autoescisión G^a, que es necesario para la autoescisión de L^a está comprendido por una de las estructuras de ramificación o cadenas de polímero.
- Opcionalmente, una de las estructuras de ramificación sirve como grupo G^a, de modo que la estructura de ramificación consiste en G^a (en lugar de comprender dicho grupo), lo que también se incluye dentro de la expresión "que comprende".
- La Figura 1 ilustra el significado de L^a, G^a, S⁰, S¹, S², S³, BS¹, BS² y BS³ usando un profármaco de polímero de hGH ejemplar.
- La preparación de un conjugado de profármaco (AA) normalmente da como resultado una mezcla de conjugados, en donde varios grupos amino primarios de hGH están conjugados, dando como resultado diferentes profármacos monoconjugados, biconjugados, triconjugados, etc. Los profármacos de hGH PEG monoconjugados, biconjugados o triconjugados correspondientes se pueden separar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, como cromatografía en columna y similares.
- En monoconjugados de profármacos de hGH PEG, las al menos tres cadenas de polímeros S⁰, S¹, S² contienen un "resto de polímero", que se caracteriza por una o más unidades de repetición, que pueden estar distribuidas aleatoriamente, por bloques o de manera alternada. Además, las al menos tres cadenas de polímeros S⁰, S¹, S² muestran un grupo terminal, que normalmente es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6

átomos de carbono, que puede estar ramificado o no ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, especialmente para cadenas de polímeros a base de PEG que dan lugar a los llamados mPEG. La expresión "a base de PEG" tal como se entiende en el presente documento se aplica a un polímero cuya proporción másica de PEG es al menos del 10 % en peso, preferiblemente al menos del 25 % y más preferiblemente al menos del 50 % sobre la base del peso total de la cadena de polímero.

Se señala que los restos de polímero dentro de las al menos tres cadenas de polímero S⁰, S¹, S² pueden tener sustituyentes adicionales, similares a una cadena, que se originan a partir de las unidades de repetición y que dan como resultado cadenas que tienen menos de 4 kDa de peso molecular y que no se consideran cadenas de polímero S⁰, S¹, S², etc. Preferiblemente, las al menos tres cadenas de polímero S⁰, S¹, S² llevan sustituyentes de menos de 1000 Da de peso molecular.

Una característica estructural relevante de S⁰ es su distancia crítica. La distancia crítica define la distancia más corta entre el sitio de unión de S⁰ a L^a y la primera estructura de ramificación BS¹ medida como átomos conectados. La longitud de la distancia crítica tiene un efecto sobre la actividad residual según se expuso para el compuesto 33 tal como se describe en el documento WO-A 2009/133137, que se incorpora por el presente documento como referencia. La distancia crítica es preferiblemente menor que 50, más preferiblemente menor que 20 y lo más preferiblemente menor que 10. Las al menos tres cadenas de polímero S⁰, S¹ y S² generalmente contienen cada una un resto de interconexión. G^a está presente en al menos uno de los restos de interconexión. Para cadenas de polímeros diferentes de S⁰, el resto de interconexión es el elemento estructural que conecta el resto de polímero de, por ejemplo, S¹ con BS¹ y el resto de polímero de S² con BS². Para S⁰, el resto de interconexión es el elemento estructural que conecta L^a y BS¹.

Los restos de interconexión pueden consistir en una cadena de alquilo C₁₋₅₀, que está ramificada o no ramificada y que opcionalmente está interrumpida o terminada por heteroátomos o grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en -O-; -S-; N(R); C(O); C(O)N(R); N(R)C(O); uno o más carbociclos o heterociclos, en donde R es hidrógeno o una cadena de alquilo C₁₋₂₀, que está opcionalmente interrumpida o terminada por uno o más de los átomos o grupos mencionados anteriormente, que además tienen un hidrógeno como átomo terminal; y en el que un carbociclo es fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; y en el que el heterociclo es un heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclilo de 9 a 11 miembros.

"Cicloalquilo C₃₋₁₀" o "anillo cicloalquilo C₃₋₁₀" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, que puede tener dobles enlaces de carbono-carbono que están al menos parcialmente saturados, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo. Cada hidrógeno de un carbono de cicloalquilo puede reemplazarse por un sustituyente. La expresión "cicloalquilo C₃₋₁₀" o "anillo cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye bicíclulos unidos, como a norbornano o norborneno.

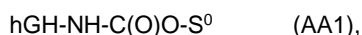
"Heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 o 7 átomos en el anillo que puede contener hasta el número máximo de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático totalmente saturado, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un átomo del anillo a hasta 4 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula mediante un átomo de carbono o de nitrógeno. Ejemplos de heterociclos de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tietano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahydrofurano, tetrahydrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahydropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepano, azequina u homopiperazina.

"Heterobiciclilo de 9 a 11 miembros" o "heterobiciclo de 9 a 11 miembros" significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos en el anillo, en el que al menos un átomo de anillo es compartido por ambos anillos y que puede contener hasta el número máximo de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático totalmente saturado, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un átomo del anillo a hasta 6 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula mediante un átomo de carbono o de nitrógeno. Ejemplos de un heterociclo de 9 a 11 miembros son: indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, quinolina, dihidroquinolina, tetrahydroquinolina, decahydroquinolina, isoquinolina, decahydroisoquinolina, tetrahydroisoquinolina, dihydroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. La expresión heterobiciclo de 9 a 11 miembros también incluye estructuras espiro de dos anillos como 1,4-dioxo-8-azaespiro[4.5]decano o heterociclos unidos como 8-aza-biciclo[3.2.1]octano.

El carbociclo, el heterociclo y el heterobiciclo pueden estar sustituidos con alquilo C₁₋₂₀, opcionalmente interrumpido o terminado por heteroátomos o grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en -O-; -S-; N(R); C(O); C(O)N(R); N(R)C(O), en el que R es hidrógeno o una cadena de alquilo C₁₋₁₀, que está opcionalmente interrumpida o

terminada por uno o más de los átomos o grupos mencionados anteriormente, que además tienen un hidrógeno como átomo terminal.

El resto de polímero de las al menos tres cadenas S⁰, S¹, S² forma la parte mayoritaria de las cadenas, preferiblemente al menos el 90 % del peso molecular de cada cadena, más preferiblemente al menos el 95 %, incluso más preferiblemente al menos el 97,5 %, incluso más preferiblemente al menos el 99 %. Por lo tanto, la base de las cadenas está representada por el resto de polímero. Las al menos tres cadenas S⁰, S¹, S² están basadas en polietilenglicol. Por consiguiente, lo mismo es válido para cadenas adicionales S³, S⁴, S⁵, etc. La cadena S⁰ comprende una estructura de ramificación BS¹, de modo que S¹ está unido a S⁰. Para la unión de S² puede usarse la estructura de ramificación BS¹ o está presente una estructura de ramificación adicional BS², que puede ser una parte de S⁰ o S¹. Por consiguiente, pueden estar presentes estructuras de ramificación adicionales, cuando están presentes cadenas adicionales. Por ejemplo, en caso de que esté presente una cadena S³, la misma puede estar unida a BS¹, a BS² o a una estructura de ramificación BS³. La estructura de ramificación BS³, si está presente, puede ser parte de S⁰, S¹ o S². En general, se puede usar cualquier entidad química que permita la ramificación de una cadena. Preferiblemente, las estructuras de ramificación se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un carbociclo al menos 3 veces sustituido, un heterociclo al menos 3 veces sustituido, un átomo de carbono terciario, un átomo de carbono cuaternario y un átomo de nitrógeno terciario, en el que los términos carbociclo y heterociclo se definen como se indicó anteriormente. En publicaciones en el campo de la autoescisión, los grupos inductores a veces se denominan enlazadores para discriminar su estructura del portador. Sin embargo, a menudo es difícil separar claramente estas características estructurales. Por lo tanto, dentro del significado de la presente invención, se considera que el grupo inductor de escisión G^a es parte del portador S, que comprende al menos S⁰, S¹, S², BS¹ y, opcionalmente, BS². La variación de la naturaleza química de G^a permite en gran medida el diseño de las propiedades de autoescisión del correspondiente profármaco unido a portador. Tal como se describió anteriormente, un profármaco PEGilado, en el que el fármaco es, por ejemplo, rhGH como se describe en la solicitud de patente WO-A 2005/099768, y tiene una característica de liberación, que se describe en tal documento como sistema de escisión 1,6 sin la producción de compuestos aromáticos tóxicos. En este documento se describen ampliamente numerosas estructuras, relevantes en el presente documento, de enlazadores transitorios adecuados para obtener un perfil de liberación de interés relevante. Otras estructuras de enlazadores transitorios se describen genérica/ampliamente en, por ejemplo, otras solicitudes de Complex Biosystems GmbH tales como los documentos WO-A 2005/034909, WO-A 2005/099768, WO-A 2006/003014 y WO-A 2006/136586. Más estructuras de enlazadores transitorios se describen ampliamente, por ejemplo, en el documento WO-A 99/30727 (Enzon Inc). Con el fin de resolver los presentes problemas para GH tal como se describe en el presente documento, los presentes inventores han seleccionado estructuras preferidas de enlazadores transitorios adecuados para obtener las propiedades funcionales relevantes del profármaco pegilado de rhGH descritas en el presente documento. Especialmente, se pueden elegir estructuras de enlazadores transitorios adecuados, que son autohidrolizables (autoescindibles) para su incorporación a S⁰. A continuación se describen en detalle las estructuras de enlazadores seleccionadas en el presente documento. Con el fin de introducir la labilidad hidrolítica en grupos funcionales L tales como amidas o carbamatos, es necesario diseñar componentes químicos estructurales en el portador para que funcionen, por ejemplo, como grupos vecinos cercanos al grupo funcional. Tales estructuras químicas inductoras de autoescisión que ejercen control sobre la capacidad de escisión del enlace amida del profármaco se denominan grupos inductores de autoescisión G^a. Los grupos inductores de autoescisión pueden tener un fuerte efecto sobre la velocidad de hidrólisis de un grupo funcional L^a dado. Las L^a desveladas se seleccionan del grupo que consiste en C(O)-O- y C(O)-, que forman junto con el grupo amino primario de hGH un grupo carbamato o amida. Por lo tanto, se prefiere una composición de la presente invención, en la que L^a se selecciona del grupo que consiste en C(O)-O- y C(O)-, que forman junto con el grupo amino primario de hGH un grupo carbamato o amida que conduce a la fórmula (AA1) o (AA2)



Las siguientes secciones enumerarán diversos componentes estructurales que pueden funcionar como grupos inductores de escisión G^a. El grupo G^a representa un grupo inductor de autoescisión. G^a puede estar presente como tal o como un grupo inductor de autoescisión en cascada, que se desmascara para hacerse efectivo por medio de una etapa de escisión hidrolítica o enzimática adicional. Si G^a está presente como tal, gobierna la autohidrólisis limitante de la velocidad de L^a.

Ejemplos para G^a:

A. J. Garman *et al.* (A. J. Garman, S. B. Kalindjan, FEBS Lett. 1987, 223 (2), 361-365 1987) usaron el anhídrido maleico PEG5000 para la modificación reversible de los grupos amino en el activador de plasminógeno del tipo tisular y la urocinasa. La regeneración de la enzima funcional del conjugado de PEG-uPA tras la incubación con tampón a pH 7,4 por escisión del enlace de ácido maleámico siguió una cinética de primer orden con una semivida de 6,1 h. Los restos aromáticos simples pueden inferir labilidad a un enlace de carbamato conectado (documento WO-A 01/47562). Por ejemplo, se usó un grupo fluorenilmetilo sustituido o no sustituido para labilizar los enlaces de

carbamato a diversos agentes bioactivos en un enfoque de profármaco (Tsubery *et al.* J Biol Chem 279 (2004) 38118-24). Se unieron dos cadenas de PEG a un resto fluorenilo en el documento WO-A 2007/075534. Por lo tanto, G^a es un anillo aromático o fluorenilmetilo directamente unido a un grupo funcional carbamato L^a.

5 Por consiguiente, se desvela una composición en la que G^a es un anillo aromático o fluorenilmetilo directamente unido a un grupo funcional carbamato formado por L^a y el grupo amino primario de hGH. Como alternativa, la transformación de G^a puede inducir un reordenamiento molecular dentro de S⁰ tal como una eliminación 1,4 o 1,6. El reordenamiento hace que L^a sea más lábil, de modo que se induce su escisión. La transformación de G^a es la etapa limitante de la velocidad en el mecanismo en cascada. Idealmente, la velocidad de escisión del enlace temporal es idéntica a la velocidad de liberación deseada para la molécula del fármaco en un escenario terapéutico dado. En dicho sistema en cascada basado en la eliminación 1,6, es deseable que la escisión de L^a sea sustancialmente instantánea después de que su labilidad haya sido inducida por la transformación de G^a. Además, es deseable que la cinética de escisión limitante de la velocidad transcurra en un marco de tiempo terapéuticamente útil sin el requisito de una contribución enzimática adicional para evitar las desventajas asociadas con la escisión predominantemente enzimática descrita anteriormente. R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, H. Zhao, Y. H. Choe, A. Martínez, K. Shum, S. Guan, J. Med. Chem., 1999, 42, 3657-3667 y la solicitud de patente PCT WO-A 99/30727 describieron una metodología para sintetizar profármacos de poli(etilenglicol) de compuestos de molécula pequeña que contienen amino basada en la eliminación de 1,4- o 1,6-bencilo. En este enfoque, el grupo amino de la molécula del fármaco se une mediante un grupo carbamato a un resto bencilo PEGilado. El poli(etilenglicol) se fijó al grupo bencilo mediante enlaces éster, carbonato, carbamato o amida. La liberación de PEG de la molécula del fármaco se produce mediante una combinación de autohidrólisis y escisión enzimática. La escisión del grupo de enmascaramiento desencadenante de la liberación es seguida en este enfoque por la eliminación clásica y rápida de 1,4- o 1,6-bencilo. Este sistema de enlazador también se usó para conjugados de proteínas de poli(etilenglicol) liberables (S. Lee, R. B. Greenwald *et al.*, Bioconj. Chem. 2001, 12(2), 163-169). La lisozima se usó como proteína modelo porque pierde su actividad cuando la PEGilación se lleva a cabo en el grupo épsilon-amino de residuos de lisina. Varias cantidades de enlazador PEG se conjugaron a la proteína. La regeneración de proteína nativa a partir de los conjugados de PEG se produjo en plasma de rata o en tampón de pH alto no fisiológico. Véase también F. M. H. DeGroot *et al.* (documentos WO-A 2002/083180 y WO-A 2004/043493) y D. Shabat *et al.* (documento WO-A 2004/019993). Por lo tanto, L^a es un grupo funcional carbamato, la escisión de este grupo está inducida por un grupo hidroxilo o amino de G^a mediante la eliminación de 1,4- o 1,6 bencilo de S⁰, en el que G^a contiene enlaces éster, carbonato, carbamato o amida que experimentan una transformación limitante de la velocidad. En efecto, G^a puede escindirse completamente mediante hidrólisis.

Por consiguiente, se describe una composición, en la que L^a forma junto con el grupo amino de hGH un grupo funcional carbamato, la escisión de dicho grupo es inducida por un grupo hidroxilo o amino de G^a mediante la eliminación de 1,4- o 1,6- bencilo de S⁰, en el que G^a contiene enlaces éster, carbonato, carbamato o amida que experimentan una transformación limitante de la velocidad. G^a puede contener un sistema de escisión en cascada habilitado por los componentes de G^a que están compuestos por una combinación estructural que representa el precursor mencionado anteriormente. Un precursor de G^a puede contener enlaces temporales adicionales tales como una amida, un éster o un carbamato. La estabilidad o susceptibilidad a la hidrólisis del enlace temporal del precursor (por ejemplo, carbamato) puede estar gobernada por propiedades autohidrolíticas o puede requerir la actividad de una enzima.

Antczak *et al.* (Bioorg Med Chem 9 (2001) 2843-48) describen un reactivo que forma la base de un sistema de profármaco en cascada macromolecular para las moléculas de fármaco que contienen amina. En este enfoque, un anticuerpo sirve como portador, un enlace estable conecta el anticuerpo a un grupo activador, portando un grupo de enmascaramiento escindible. Tras la eliminación del grupo de enmascaramiento unido a éster, L^a se escinde y libera el compuesto farmacológico.

D. Shabat *et al.* (Chem. Eur. 3. 2004, 10, 2626-2634) describen un sistema de profármaco de polímero basado en un grupo activador de ácido mandélico. En este sistema, el grupo de enmascaramiento está unido al grupo activador mediante un enlace de carbamato. El grupo activador se conjuga permanentemente con un polímero de poli(acrilamida) a través de un enlace amida. Después de la activación del grupo de enmascaramiento por un anticuerpo catalítico, el grupo de enmascaramiento se escinde por ciclación y se libera el fármaco. El grupo activador todavía está conectado al polímero de poli(acrilamida) después de la liberación del fármaco.

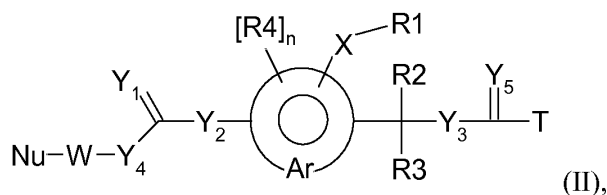
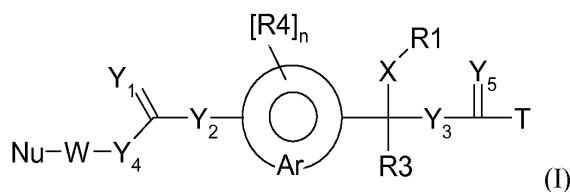
M.-R. Lee *et al.* (Angew. Chem. 2004, 116, 1707-1710) describen un sistema de profármaco similar basado en un grupo activador de ácido mandélico y un grupo de enmascaramiento unido a éster. Sin embargo, en estos enlazadores, una etapa de eliminación 1,6 todavía genera un intermedio aromático altamente reactivo. Incluso si el resto aromático permanece permanentemente unido al portador de polímero, pueden producirse reacciones secundarias con efectos potencialmente tóxicos o inmunogénicos.

Greenwald *et al.* publicaron en 2000 un sistema de administración de fármaco de poli(etilenglicol) de profármacos que contienen grupos amino basado en lactonización por bloqueo de trimetilo (RB Greenwald *et al.* J. Med. Chem. 2000, 43 (3), 457-487; documento WO-A 02/089789). En este sistema de profármaco, el ácido o-hidroxifenil-

dimetilpropiónico sustituido está acoplado a los grupos amino de las moléculas del fármaco mediante un enlace amida. El grupo hidroxilo está unido a PEG por un grupo éster, carbonato o carbamato. La etapa de determinación de la velocidad en la liberación del fármaco es la escisión enzimática de estos grupos funcionales seguida por la escisión rápida de la amida mediante lactonización, liberando un producto secundario de lactona aromática.

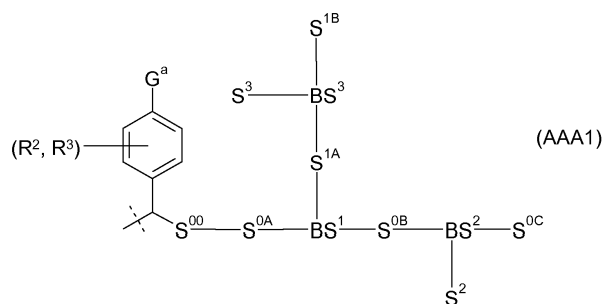
5 Más recientemente, R. B. Greenwald *et al.* (Greenwald *et al.*, J. Med. Chem. 2004, 47, 726-734) describieron un sistema de profármaco de PEG basado en el enlazador bis-(N-2-hidroxietil)glicinamida (bicinamida). En este sistema, dos moléculas de PEG están unidas a una molécula de bicina acoplada a un grupo amino de la molécula de fármaco. Las dos primeras etapas en la activación del profármaco son la escisión enzimática de ambas moléculas de PEG. Se describen diferentes enlaces entre PEG y bicina dando como resultado una cinética de
10 activación del profármaco diferente. La principal desventaja de este sistema es la lenta velocidad de hidrólisis de bicinamida conjugada con la molécula del fármaco ($t_{1/2} = 3$ h en tampón fosfato) que conduce a la liberación de un compuesto intermedio del profármaco modificado con bicina que puede mostrar diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que la molécula de fármaco original. A continuación, se describen los grupos L^a y G^a con restos espaciadores específicos para S⁰.

15 Una estructura según el documento WO-A 2005/099768 se selecciona de las fórmulas generales (I) y (II):



en las que, en estas fórmulas, T representa hGH-NH; X representa un resto espaciador; Y₁ e Y₂ cada uno independientemente representa O, S o NR₆; Y₃ e Y₅ independientemente entre sí representan O o S; Y₄ representa O, NR₆ o -C(R₇)(R₈); R₂ y R₃ independientemente entre sí representan un resto seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo o heteroalquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, arilos, arilos sustituidos, heteroarilos sustituidos o no sustituidos, grupos ciano, grupos nitro, halógenos, grupos carboxi, grupos carboxialquilo, grupos alquilcarbonilo o grupos carboxamidoalquilo; R₄ representa un resto seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o heteroalquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, arilos, arilos sustituidos, heteroarilo sustituido o no sustituido, alcoxis lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, heteroalquiloxilos, ariloxilos o heteroariloxilos lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, grupos ciano y halógenos; R₇ y R₈ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo o heteroalquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, arilos, arilos sustituidos, heteroarilos sustituidos o no sustituidos, grupos carboxialquilo, grupos alquilcarbonilo, grupos carboxamidoalquilo, grupos ciano y halógenos; R₆ representa un grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo o heteroalquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, arilos, arilos sustituidos y heteroarilos sustituidos o no sustituidos; R₁ representa el residuo de S⁰; W representa un grupo seleccionado entre alquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, arilos, arilos sustituidos, heteroalquilo lineales, ramificados o cíclicos sustituidos o no sustituidos, heteroarilos sustituidos o no sustituidos; Nu representa un nucleófilo; n representa cero o un generador de imágenes positivo; y Ar representa un hidrocarburo aromático multisustituido o un heterociclo aromático multisustituido. El grupo L^a desvelado está representado por Y₃-C(Y₅)NH- (junto con el grupo amino de hGH), G^a está representado por Nu-W-Y₄-C(Y₁)Y₂ y Ar (R₄)_n-C(R₃)XR₁ representa S⁰, que además incluye al menos S¹, S², BS¹ y opcionalmente BS².

En una divulgación alternativa, S¹ se une mediante Ar o representa R₃. Entonces, el átomo de carbono adyacente a Y₃ sustituido con XR₁ representa la estructura de ramificación BS¹, S¹ se termina con Ar que comprende G^a. Es evidente que en esta realización los términos S⁰ y S¹ son intercambiables. En la fórmula (AA) o (AA1) S⁰ es de fórmula (AAA1)



en la que en la fórmula (AAA1)

G^a tiene el significado indicado anteriormente;

S⁰⁰ es CH₂; o C (O);

5 S^{0A} es una cadena de alquileo que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, que está opcionalmente interrumpida o terminada por uno o más grupos, ciclos o heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en heterociclo opcionalmente sustituido; O; S; C(O); y NH;

10 BS¹, BS², BS³ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en N; y CH. S^{0B}, S^{1A} son independientemente una cadena de alquileo que tiene de 1 a 200 átomos de carbono, que está opcionalmente interrumpida o terminada por uno o más grupos, ciclos o heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en heterociclo opcionalmente sustituido; O; S; C(O); y NH;

S^{0C}, S^{1B} son (C(O))_{n2}(CH₂)_{n1}(OCH₂CH₂)_nOCH₃, en el que cada n es independientemente un número entero de 100 a 500, cada n1 es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y n2 es 0 o 1.

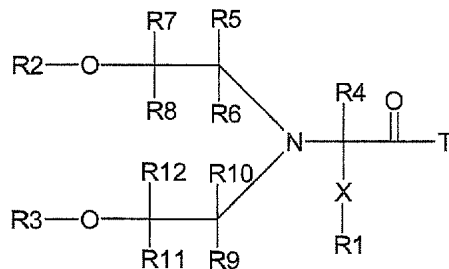
15 S², S³ son independientemente hidrógeno; o (C(O))_{n2}(CH₂)_{n1}(OCH₂CH₂)_nOCH₃, en el que cada n es independientemente un número entero de 100 a 500, cada n1 es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y n2 es 0 o 1, siempre que al menos uno de S², S³ sea diferente de hidrógeno;

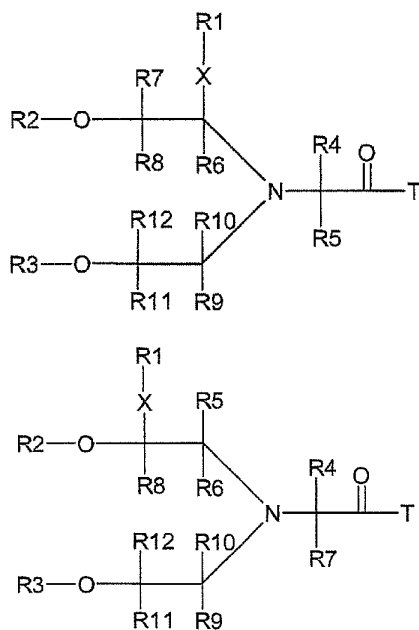
R², R³ se definen como para la siguiente fórmula (A).

20 El término heterociclo significa un heterociclo tal como se definió anteriormente. Los sustituyentes opcionales son, por ejemplo, oxo (=O), en el que el anillo es al menos parcialmente saturado, una cadena de alquilo ramificada o no ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o halógeno. Un heterociclo sustituido preferido es succinimida.

G^a en la fórmula (AAA1) es OC(O)-R y R es la estructura parcial de fórmula (I) tal como se muestra a continuación, en la que R1, R4, R5 y n se definen como se indica a continuación.

Se describe otra divulgación en el documento WO06136586A2. Por consiguiente, las siguientes estructuras son:





en las que, en estas tres estructuras, T es NH-hGH;

X es un resto espaciador tal como R13-Y1;

5 Y1 es O, S, NR6, succinimida, maleimida, enlaces carbono-carbono insaturados o cualquier heteroátomo que contiene un par de electrones libres o está ausente;

R13 se selecciona entre alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido, arilos, arilos sustituidos, heteroarilos sustituidos o no sustituidos;

10 R2 y R3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, grupos acilo o grupos protectores para grupos hidroxilo;

R4 a R12 se seleccionan independientemente de hidrógeno, X-R1, alquilo o heteroalquilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o no sustituido, arilos, arilos sustituidos, heteroarilos sustituidos o no sustituidos, ciano, nitro, halógeno, carboxi, carboxamida;

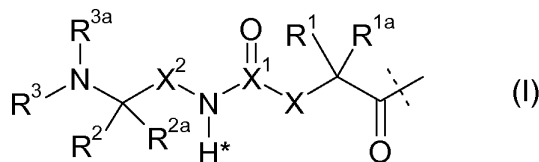
R1 es el residuo de S⁰, que comprende al menos S¹, S², BS¹, y opcionalmente BS².

15 L^a es un grupo amida, y G^a incluye la estructura ramificada en N que lleva OR₂/OR₃. En otra divulgación, se proporciona una estructura mediante un conjugado de profármaco D-L, en el que

- D es NH-hGH; y

- L es un

resto de enlazador no biológicamente activo -L¹ representado por la fórmula (I),



20

en la que, en la fórmula (I), la línea discontinua indica la unión al grupo amino de hGH formando un enlace amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴); O; C(R⁴R^{4a})-C(R⁵R^{5a}); C(R⁵R^{5a})-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-N(R⁶); N(R⁶)-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-O; o O-C(R⁴R^{4a});

X¹ es C; o S(O);

25 X² es C(R⁷, R^{7a}); o C(R⁷, R^{7a})-C(R⁸, R^{8a});

R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, R^{4a}, R⁵, R^{5a}, R⁶, R⁷, R^{7a}, R⁸, R^{8a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄; u

opcionalmente, uno o más de los pares R^{1a}/R^{4a}, R^{1a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{7a}/R^{8a} forman un enlace químico;

opcionalmente, uno o más de los pares R¹/R^{1a}, R²/R^{2a}, R⁴/R^{4a}, R⁵/R^{5a}, R⁷/R^{7a}, R⁸/R^{8a} se unen junto con el átomo al que están unidos para formar un cicloalquilo C₃₋₇; o un heterociclo de 4 a 7 miembros;

30 opcionalmente, uno o más de los pares R¹/R⁴, R¹/R⁵, R¹/R⁶, R⁴/R⁵, R⁷/R⁸, R²/R³ se unen junto con los átomos a

los que están unidos para formar un anillo A;

opcionalmente, R³/R^{3a} se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros;

5 A se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclilo de 4 a 7 miembros; y heterobiciclilo de 9 a 11 miembros; y

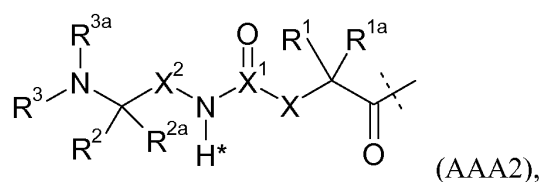
en la que L¹ está sustituido con un grupo L²-Z y opcionalmente sustituido de manera adicional, siempre que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (I) no esté reemplazado por un sustituyente; en la que

L² es un enlace químico simple o un espaciador; y

Z es el resto de S⁰, que comprende al menos S¹, S², BS¹, y opcionalmente BS².

10 L^a está representado por un grupo amida y G^a está representado por N(H*)X¹(O) y la cadena que se conecta a N incluyendo los sustituyentes de N. Conjugados de profármaco de este tipo se describen en la solicitud de patente europea n.º 08150973.9.

Por consiguiente, se revela una composición, en la que L^a-S⁰ está representado por la fórmula (AAA2),



15 en la que, en la fórmula (AAA2), la línea discontinua indica la unión al grupo amino primario de hGH, de modo que L^a y el grupo amino forman un enlace amida;

X es C(R⁴R^{4a}); N(R⁴); O; C(R⁴R^{4a})-C(R⁵R^{5a}); C(R⁵R^{5a})-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-N(R⁶); N(R⁶)-C(R⁴R^{4a}); C(R⁴R^{4a})-O; o O-C(R⁴R^{4a});

X¹ es C; o S(O);

20 X² es C(R⁷, R^{7a}); o C(R⁷, R^{7a})-C(R⁸, R^{8a});

R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, R^{4a}, R⁵, R^{5a}, R⁶, R⁷, R^{7a}, R⁸, R^{8a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C₁₋₄; u

opcionalmente, uno o más de los pares R^{1a}/R^{4a}, R^{1a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{4a}/R^{5a}, R^{7a}/R^{8a} forman un enlace químico;

25 opcionalmente, uno o más de los pares R¹/R^{1a}, R²/R^{2a}, R⁴/R^{4a}, R⁵/R^{5a}, R⁷/R^{7a}, R⁸/R^{8a} se unen junto con el átomo al que están unidos para formar un cicloalquilo C₃₋₇; o un heterociclilo de 4 a 7 miembros;

opcionalmente, uno o más de los pares R¹/R⁴, R¹/R⁵, R¹/R⁶, R⁴/R⁵, R⁷/R⁸, R²/R³ se unen junto con los átomos a los que están unidos para formar un anillo A;

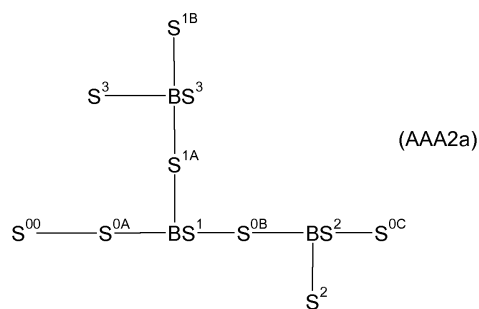
opcionalmente, R³/R^{3a} se unen junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo de 4 a 7 miembros;

30 A se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; un heterociclilo de 4 a 7 miembros; y un heterobiciclilo de 9 a 11 miembros; y

en la que S⁰ está sustituido con un grupo L²-Z y opcionalmente sustituido de manera adicional, siempre que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (AAA2) no esté reemplazado por un sustituyente; en la que

L² es un enlace químico simple o un espaciador; y

35 Z es de fórmula (AAA2a)



en la que S⁰⁰, S^{0A}, S^{0B}, S^{1A}, S^{1B}, S², S³, BS¹, BS² y BS³ tienen el significado indicado para la fórmula (AAA1) anterior.

5 "Alquilo" significa una cadena de carbonos ramificada o una cadena lineal. Cada hidrógeno de un carbono del alquilo puede ser reemplazado por un sustituyente.

"Alquilo C₁₋₄" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 4 átomos de carbono, por ejemplo si está presente al final de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, o por ejemplo, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₄ puede ser reemplazado por un sustituyente.

10 "Alquilo C₁₋₆" significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 6 átomos de carbono, por ejemplo, si está presente al final de una molécula: alquilo C₁₋₄, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo; terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, o por ejemplo, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₆ puede ser reemplazado por un sustituyente. La expresión "alquilo C₁₋₈" se define de acuerdo con esto.

15 Por consiguiente, "alquilo C₁₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono y "alquilo C₈₋₁₈" significa una cadena de alquilo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono. Por consiguiente, "alquilo C₁₋₅₀" significa una cadena de alquilo que tiene 1 a 50 átomos de carbono.

20 "Alquenilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquenilo ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, por ejemplo, si está presente al final de una molécula: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, o, por ejemplo, -CH=CH-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquenilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquenilo C₂₋₅₀ puede ser reemplazado por un sustituyente tal como se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alquenilo" se refiere a una cadena de carbono con al menos un doble enlace carbono-carbono. Opcionalmente, pueden estar presentes uno o más triples enlaces.

25 "Alquinilo C₂₋₅₀" significa una cadena de alquinilo ramificada o no ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, por ejemplo, si está presente al final de una molécula: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, o por ejemplo -C≡C- cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquinilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquinilo C₂₋₅₀ puede ser reemplazado por un sustituyente tal como se especifica adicionalmente. Por consiguiente, el término "alquinilo" se refiere a una cadena de carbono con al menos un triple enlace carbono-carbono. Opcionalmente, pueden estar presentes uno o más enlaces dobles.

30 "Cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo cicloalquilo C₃₋₇" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que puede tener enlaces dobles carbono-carbono saturados al menos parcialmente, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono de cicloalquilo puede ser reemplazado por un sustituyente. La expresión "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo cicloalquilo C₃₋₇" también incluye bicíclo unidos, como norbornano o norborneno. Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₅" significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₁₀" significa un alquilo cíclico que tiene 3 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₇; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoililo, ciclodecilo. La expresión "cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye carbamono- y -bicíclo al menos parcialmente saturados.

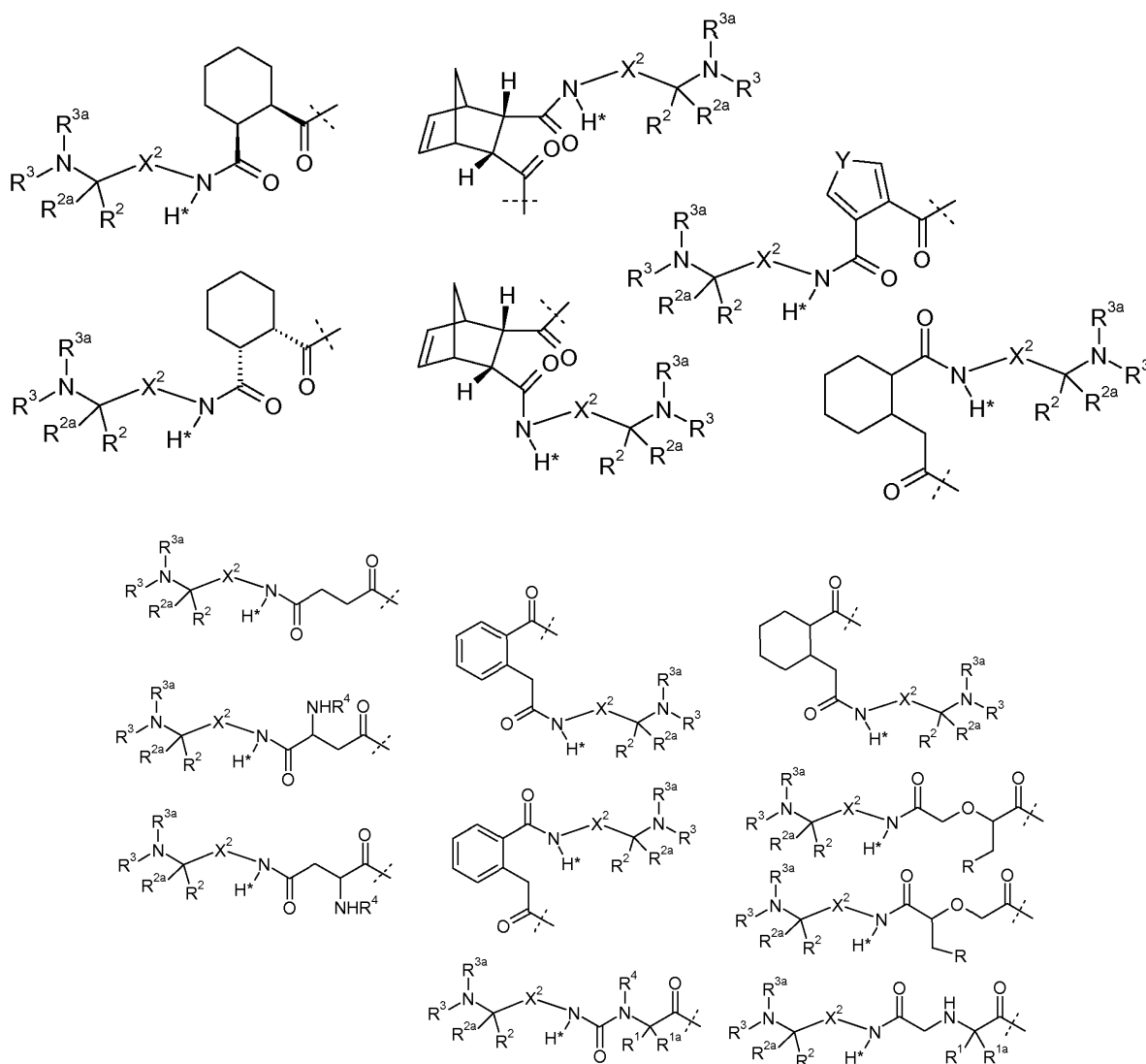
"Halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo. Generalmente se prefiere que el halógeno sea flúor o cloro.

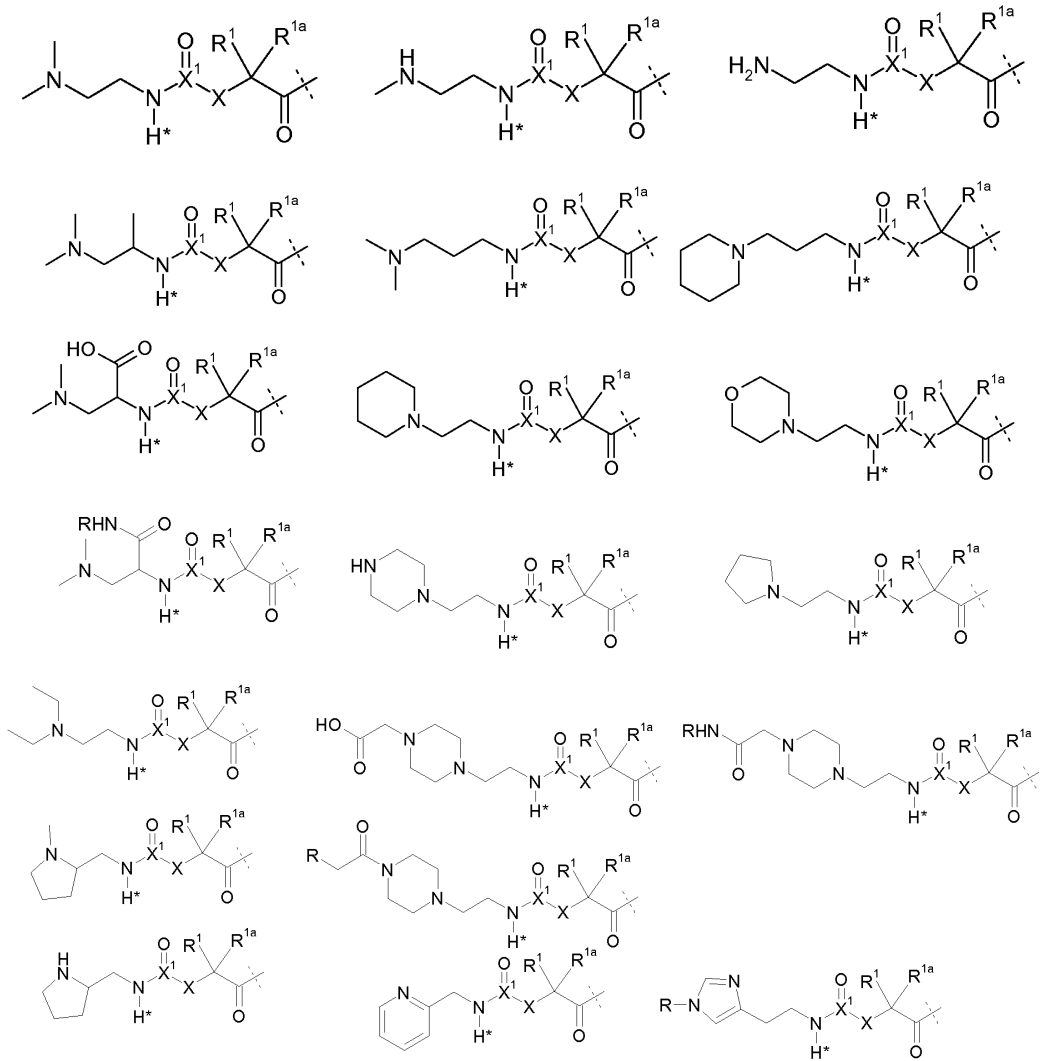
40 "Heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 o 7 átomos en el anillo que puede contener hasta el número máximo de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático totalmente saturado, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un átomo del anillo a hasta 4 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno

y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula mediante un átomo de carbono o nitrógeno. Ejemplos de heterociclos de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tetano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahydrofurano, tetrahydrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepano, azepina u homopiperazina.

"Heterobiciclilo de 9 a 11 miembros" o "heterobiciclo de 9 a 11 miembros" significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos en el anillo, en el que al menos un átomo de anillo es compartido por ambos anillos y que puede contener hasta el número máximo de enlaces dobles (anillo aromático o no aromático totalmente saturado, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un átomo del anillo a hasta 6 átomos del anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula mediante un átomo de carbono o nitrógeno. Ejemplos de un heterobiciclo de 9 a 11 miembros son: indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, bencisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, quinolina, dihidroquinolina, tetrahydroquinolina, decahydroquinolina, isoquinolina, decahydroisoquinolina, tetrahydroisoquinolina, dihydroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. La expresión heterobiciclo de 9 a 11 miembros también incluye estructuras espiro de dos anillos como 1,4-dioxo-8-azaespiro [4.5]decano o heterociclos unidos, como 8-aza-biciclo[3.2.1]octano.

L^a-S⁰ se selecciona del grupo que consiste en

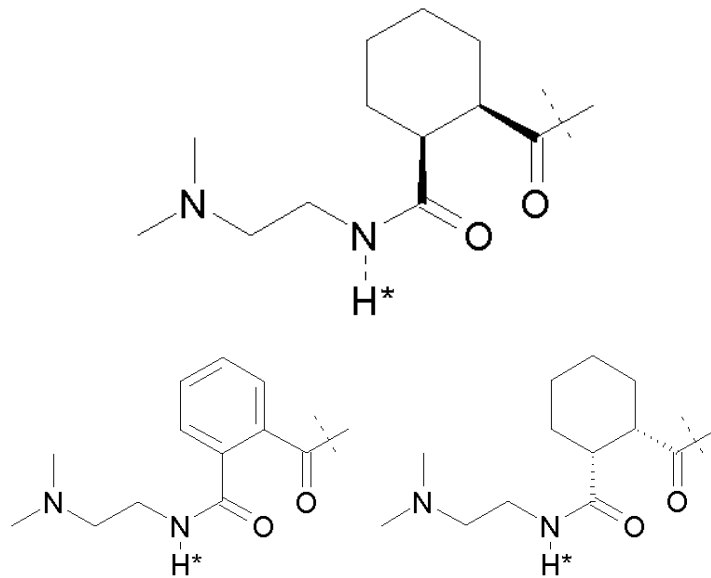




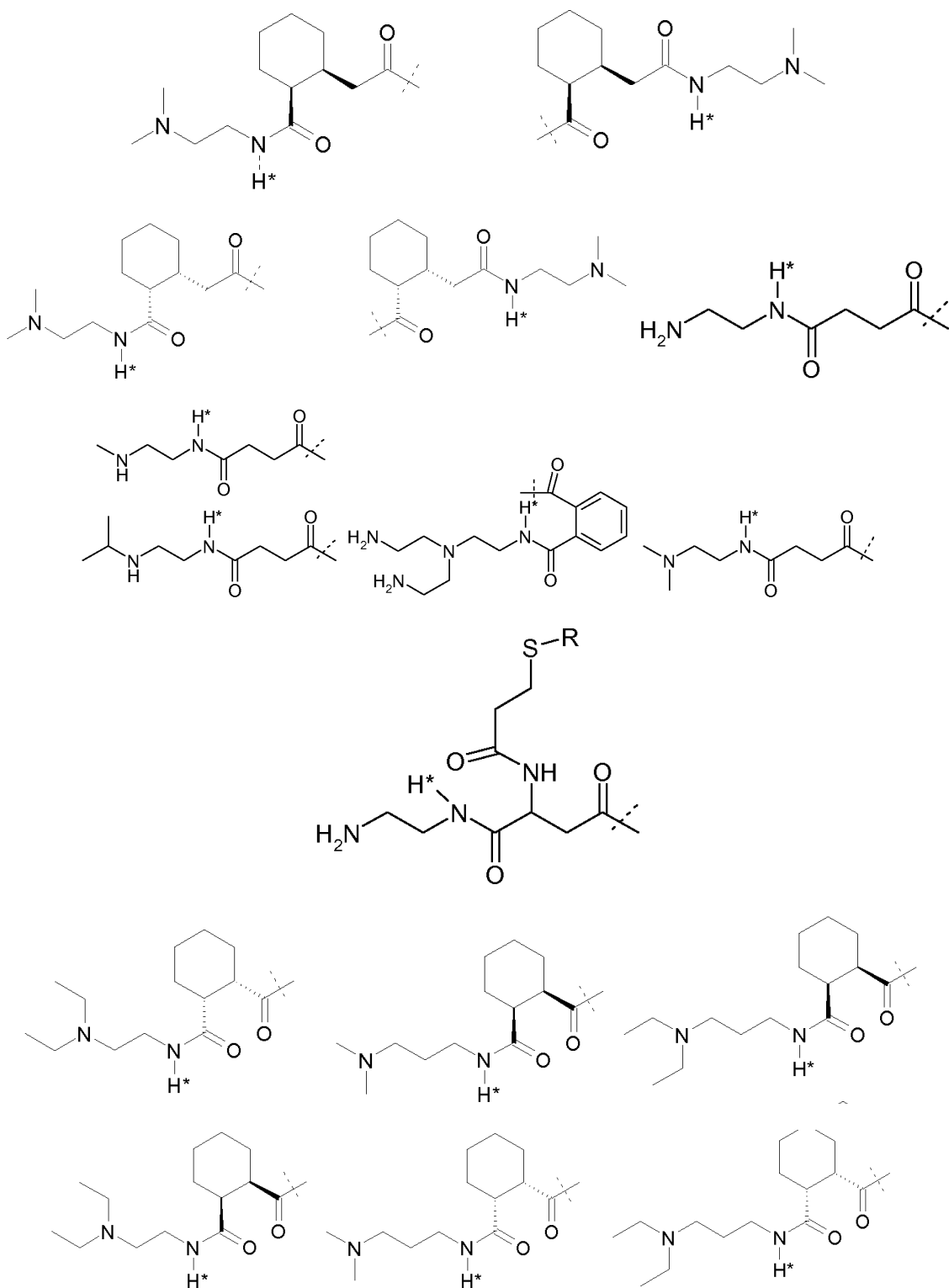
5

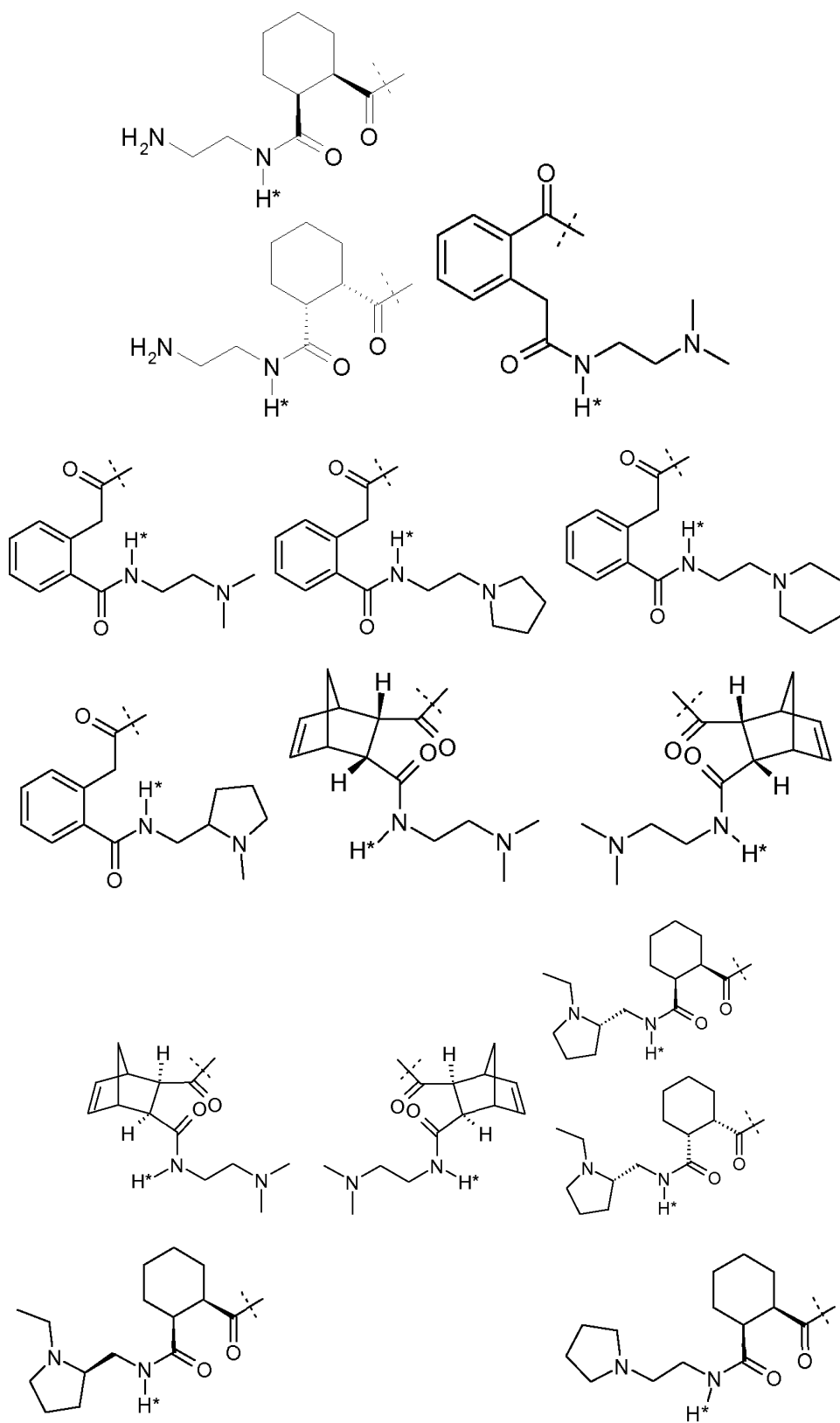
en el que R es H; o alquilo C₁₋₄; Y es NH; O; o S; y R¹, R^{1a}, R², R^{2a}, R³, R^{3a}, R⁴, X, X¹, X² tienen los significados que se indicaron anteriormente.

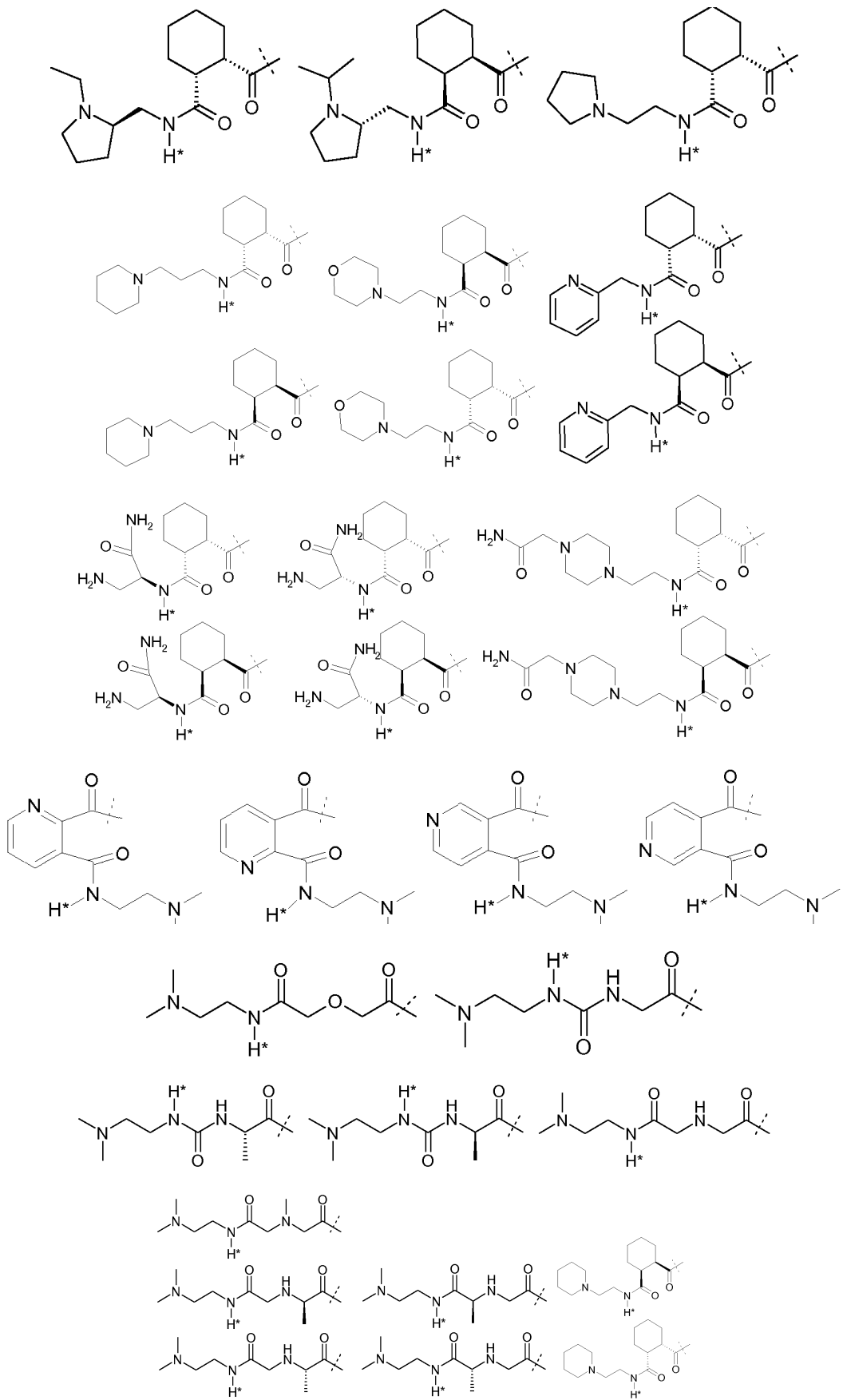
L^a-S⁰ se selecciona del grupo que consiste en

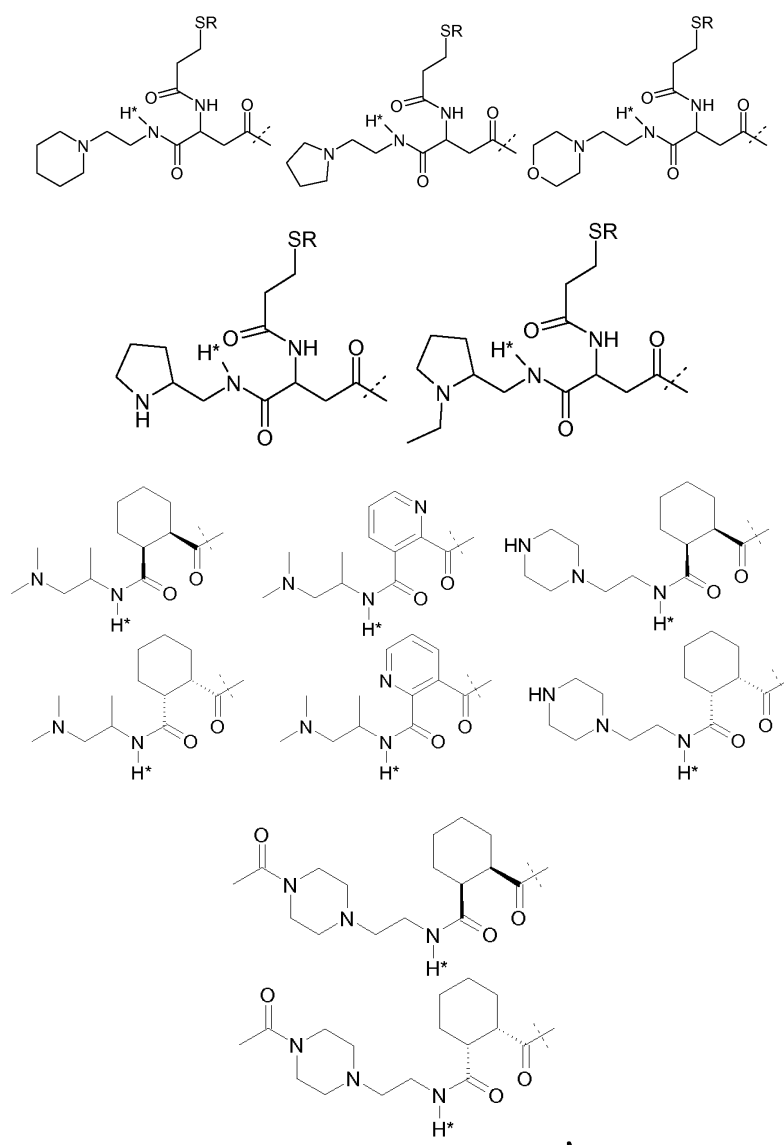


10









5 en el que R tiene el significado indicado anteriormente.

Al menos un hidrógeno (hasta cuatro) es reemplazado por un grupo L²-Z. En caso de que más de un grupo L²-Z esté presente, cada L² y cada Z se pueden seleccionar de forma independiente. Preferiblemente, solo está presente un grupo L²-Z.

10 En general, S⁰ puede sustituirse con L²-Z en cualquier posición aparte del reemplazo del hidrógeno marcado con un asterisco en las fórmulas anteriores. Preferiblemente, uno a cuatro de los hidrógenos dados por R, R¹ a R⁸ directamente o como hidrógeno del alquilo C₁₋₄ u otros grupos y anillos dados por la definición de R y R¹ a R⁸ son reemplazados por L²-Z.

Además, S⁰ puede estar opcionalmente sustituido de manera adicional. En general, se puede usar cualquier sustituyente siempre que el principio de escisión no se vea afectado.

15 Preferiblemente, uno o más sustituyentes opcionales adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂N(R⁹R^{9a}); S(O)N(R⁹R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R⁹R^{9a}); SR⁹; N(R⁹R^{9a}); NO₂; OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; o alquinilo C₂₋₅₀ en el que T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en el que alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});

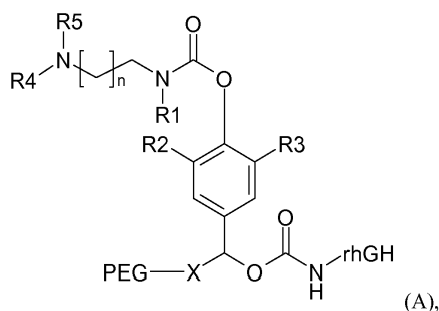
20

- R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; T; y alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; o alquinilo C₂₋₅₀, en el que T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en el que alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});
- T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclilo de 9 a 11 miembros, en el que T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes;
- R¹⁰ es halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; O¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en el que alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;
- R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; o alquilo C₁₋₆, en el que alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes.

El término "interrumpido" significa que se inserta un grupo entre dos carbonos o al final de la cadena de carbono entre el carbono y el hidrógeno.

L² es un enlace químico simple o un espaciador. En caso de que L² sea un espaciador, se define preferiblemente como uno o más sustituyentes opcionales definidos anteriormente, siempre que L² esté sustituido con Z.

- Por consiguiente, cuando L² es distinto de un enlace químico simple, L²-Z es COOR⁹; OR⁹; C(O)R⁹; C(O)N(R^{9a}R^{9a}); S(O)₂N(R^{9a}R^{9a}); S(O)N(R^{9a}R^{9a}); S(O)₂R⁹; S(O)R⁹; N(R⁹)S(O)₂N(R^{9a}R⁹); SR⁹; N(R^{9a}R^{9a}); OC(O)R⁹; N(R⁹)C(O)R^{9a}; N(R⁹)S(O)₂R^{9a}; N(R⁹)S(O)R^{9a}; N(R⁹)C(O)OR^{9a}; N(R⁹)C(O)N(R^{9a}R^{9b}); OC(O)N(R⁹R^{9a}); T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; o alquinilo C₂₋₅₀, en el que T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en el que alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -T-, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});
- R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; T; y alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; o alquinilo C₂₋₅₀, en el que T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en el que alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂N(R¹¹)-; -S(O)N(R¹¹)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂N(R^{11a})-; -S-; -N(R¹¹)-; -OC(O)R¹¹; -N(R¹¹)C(O)-; -N(R¹¹)S(O)₂-; -N(R¹¹)S(O)-; -N(R¹¹)C(O)O-; -N(R¹¹)C(O)N(R^{11a})-; y -OC(O)N(R¹¹R^{11a});
- T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C₃₋₁₀; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclilo de 9 a 11 miembros, en el que T está opcionalmente sustituido con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes;
- R¹⁰ es Z; halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C₁₋₆, en el que alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;
- R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; o alquilo C₁₋₆, en el que alquilo C₁₋₆ está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes, siempre que uno de R⁹, R^{9a}, R^{9b}, R¹⁰, R¹¹, R^{11a}, R¹², R^{12a}, R^{12b} sea Z. El profármaco de polímero de hGH tiene la estructura dada en la fórmula (A).



45

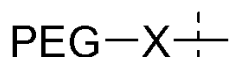
en la que, en la fórmula (A)

NH-rhGH representa el residuo de rhGH unido al enlazador transitorio formando un enlace de carbamato;

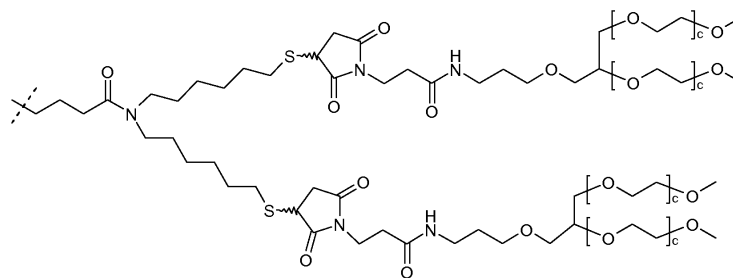
R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo,

butilo terciario,
 PEG representa un residuo de PEGilación fijado al enlazador transitorio,
 y n = 1 o 2 y
 X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12.

5 Preferiblemente, el resto



de la fórmula (A) tiene la siguiente estructura

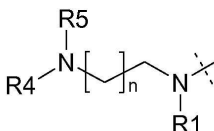


10 en la que c es independientemente un número entero de 250 a 750, preferiblemente un número entero de 300 a 400 y más preferiblemente 500.

La expresión "heteroalquilo C1 a C12" significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono que está opcionalmente interrumpida por heteroátomos, grupos funcionales, carbociclos o heterociclos como se definió anteriormente. La expresión "alquilo C1 a C8" significa alquilo C₁₋₈ como se definió anteriormente.

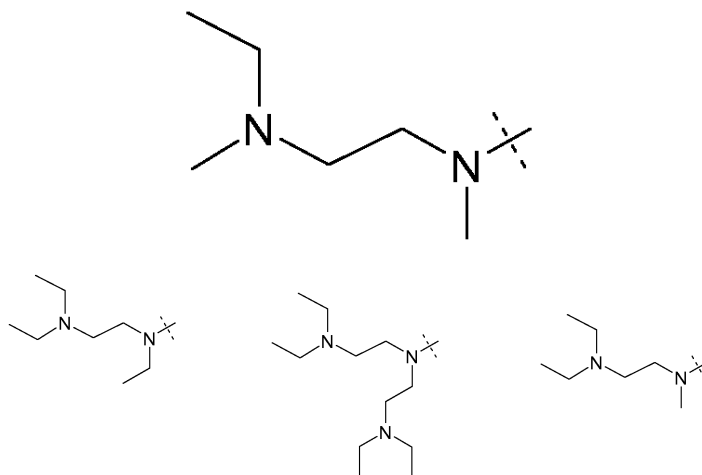
15 En una realización preferida, en la fórmula (A), L^a está representada por el grupo carbamato unido a rhGH, G^a está representado por el grupo de oxígeno aromático, el carbonilo unido a él y el sustituyente unido al carbonilo como se muestra en la fórmula I a continuación.

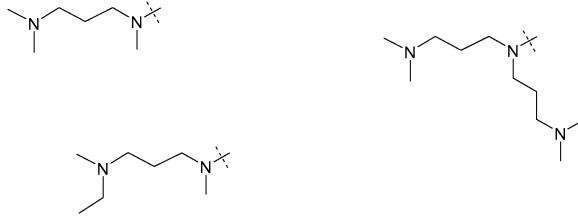
Están representadas estructuras más preferidas por la fórmula general I, las cuales son parte de la estructura (A) dentro de la anterior estructura general de enlazador aromático:



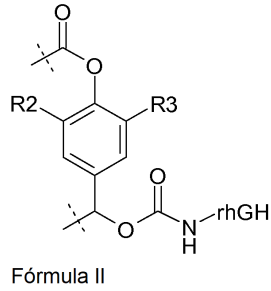
Fórmula I

20 y en la que los ejemplos preferidos de la Fórmula I comprenden:

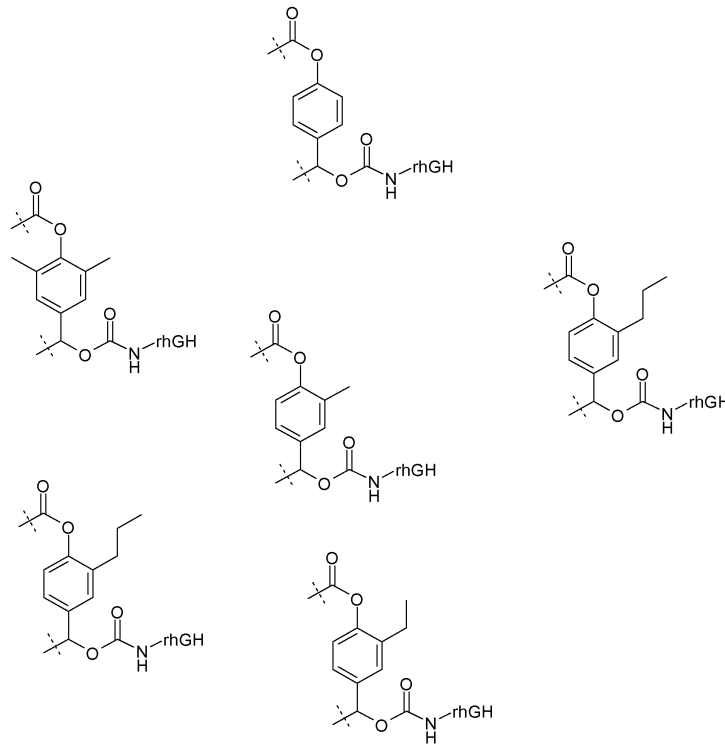




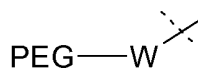
Estructuras más preferidas de fórmula general II que son parte de la estructura (A) dentro de la anterior estructura general de enlazador aromático:



5 en donde los ejemplos preferidos de la Fórmula II comprenden:

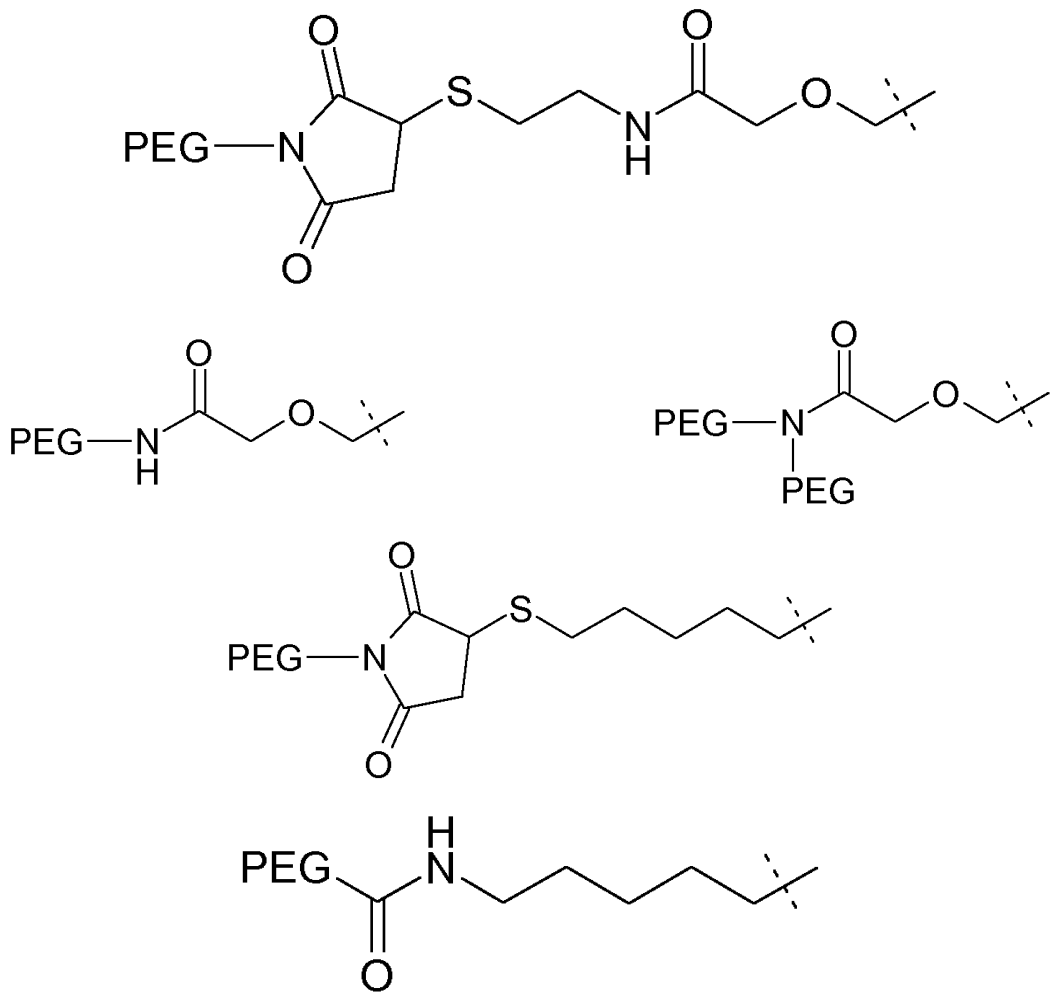


Estructuras más preferidas de fórmula general III que son parte de la estructura (A) dentro de la anterior estructura general de enlazador aromático, en la que PEG-X es:

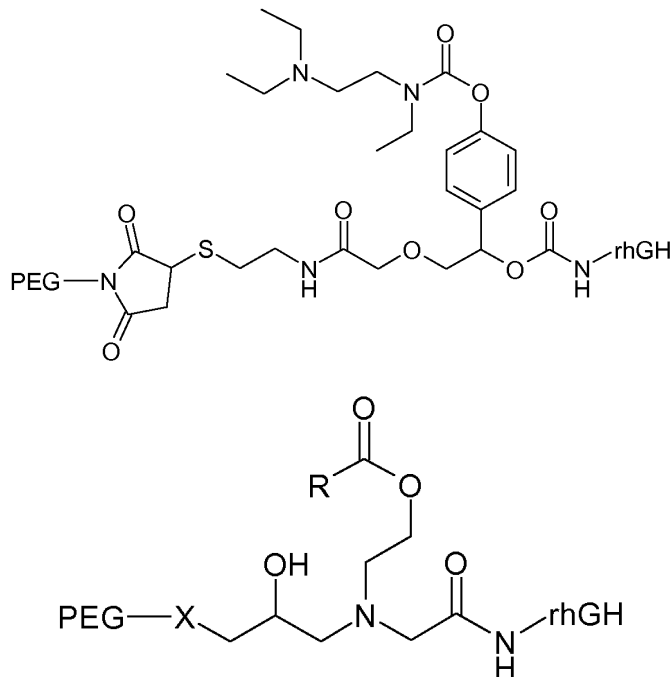


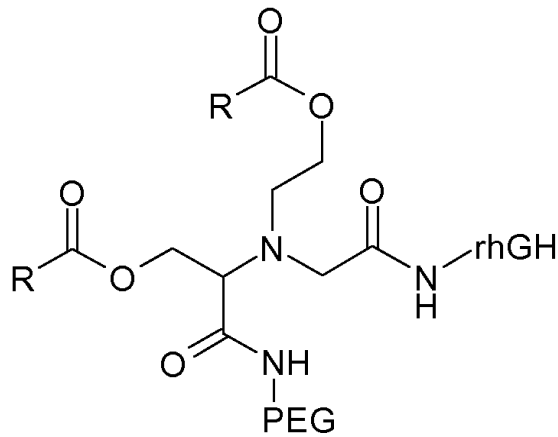
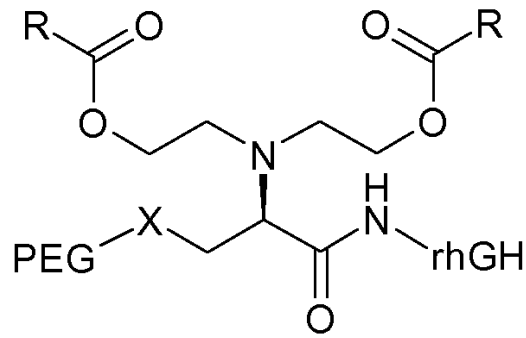
Fórmula III

10 y PEG-W incluye los siguientes grupos sustituyentes:



5 A continuación, se muestran ejemplos adicionales de conjugados de profármaco de polímero de hGH preferidos:

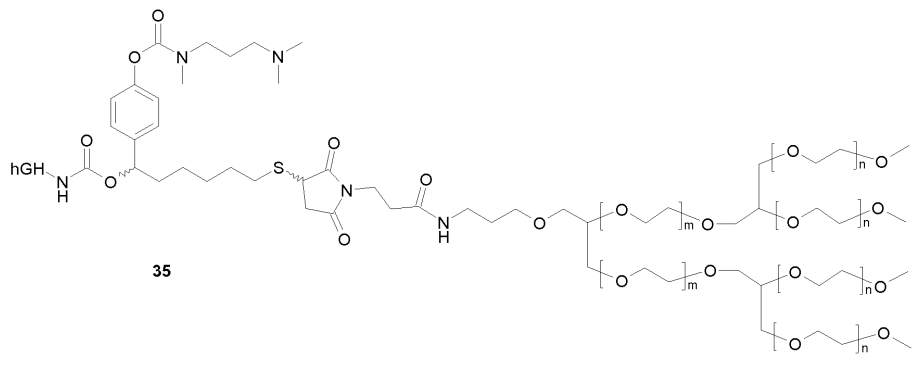




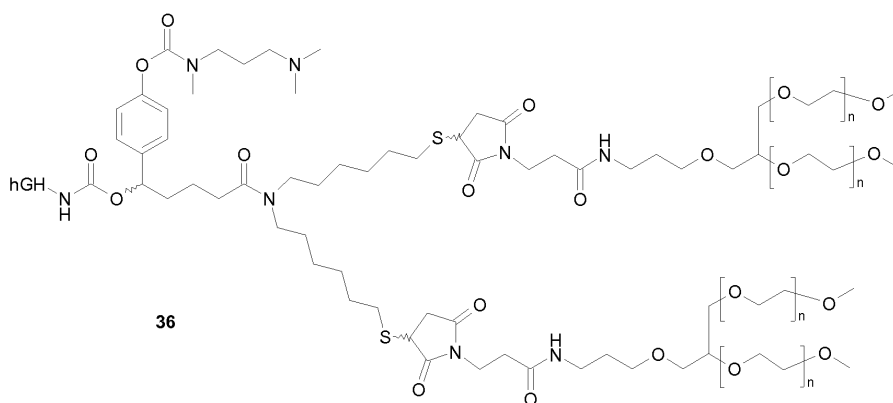
R se selecciona de hidrógeno, metilo, etilo, propilo y butilo,

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

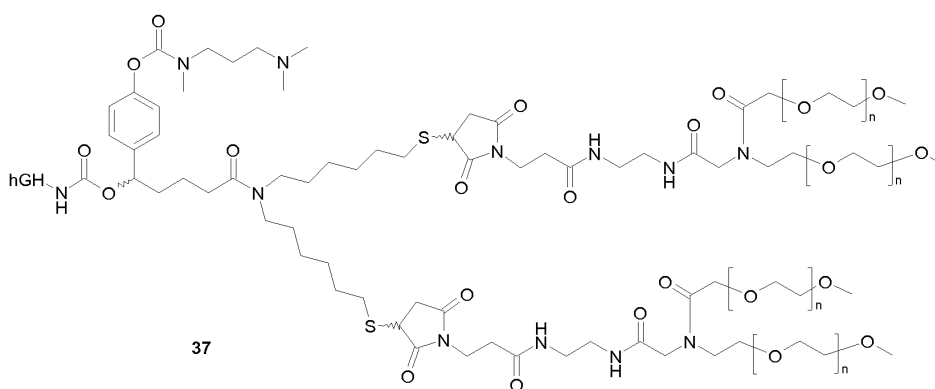
- 5 También en las realizaciones preferidas y más preferidas, PEG significa preferiblemente el resto de S^0 , que comprende al menos S^1 , S^2 , BS^1 y opcionalmente BS^2 . En una realización preferida, los profármacos comprendidos en las composiciones de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en



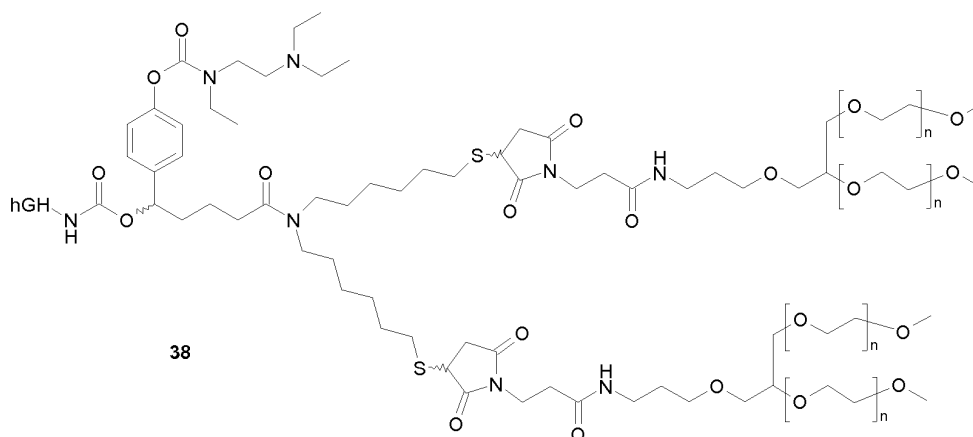
en el que m es un número entero de 200 a 250 y n es un número entero de 100 a 125;



en el que n es un número entero de 400 a 500;



en el que n es un número entero de 400 a 500; y



5

en el que n es un número entero de 400 a 500.

Preferiblemente, la PEGilación del resto de hGH se produce en una o más de las lisinas seleccionadas del grupo que consiste en Lys158, Lys145, Lys38, Lys140 y Lys70. Más preferiblemente, la PEGilación del resto de hGH se produce principalmente en las posiciones Lys158, Lys145, Lys38 y Lys140, incluso con más preferencia principalmente en las posiciones Lys158, Lys145 y Lys38.

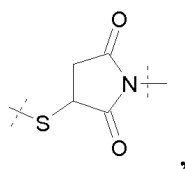
10

Preferiblemente, al menos el 30 % de todos los restos de hormona de crecimiento de la composición de la presente invención están PEGilados en la posición Lys158.

Los profármacos de polímero de hGH comprendidos en las composiciones secas de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, especialmente para compuestos de

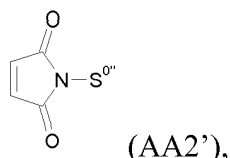
5 fórmula (AA1) se prefiere construir la molécula de profármaco en una síntesis convergente proporcionando una primera molécula precursora que comprende uno o más grupos tiol y un grupo carbonato activado y una segunda molécula precursora que comprende un grupo maleimida para que reaccione en una reacción de adición que da como resultado la formación de un grupo tio succinimida y hacer reaccionar esa molécula precursora combinada con hGH para producir un compuesto de fórmula (AA1).

Por consiguiente, un método para la preparación de un compuesto de fórmula hGH-NH-C(O)O-S⁰ (AA1), en la que S⁰ tiene el significado indicado anteriormente y que comprende al menos un grupo

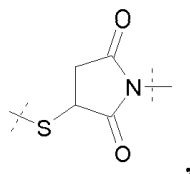


comprende las siguientes etapas:

10 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula ROC(O)O-S^{0'}-SH (AA1') con un compuesto de fórmula



en la que R es un residuo adecuado para un grupo carbonato activado y en la que S^{0'} y S^{0''} se seleccionan para producir S⁰ que comprende al menos un grupo



15 dando como resultado un compuesto de fórmula ROC(O)O-S⁰ y

(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula ROC(O)OS₀ con hGH-NH₂, en la que hGH-NH₂ representa hGH con uno de sus grupos amino primarios para producir un compuesto de fórmula (AA1).

20 Grupos R adecuados para los grupos funcionales carbonato incluyen grupos alquilo sustituido o grupos carbocíclicos o heterocíclicos, como arilo o cicloalquilo, tal como el grupo pentafluorofenilo o NHS. La composición estable comprendida por profármaco de polímero de rhGH como se describió anteriormente es una composición seca con vida útil preferiblemente de al menos 6 meses, más preferiblemente de al menos 1 año, más preferiblemente de al menos 2 años, cuando se almacena a temperaturas que oscilan entre -80 °C y 25 °C, preferiblemente que oscilan entre 2 y 25 °C. El método preferido de secado de la composición de profármaco de polímero de rhGH es la liofilización. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es una composición que se seca por liofilización. Otro aspecto es una composición de la presente invención que es estable durante al menos 1 año cuando se almacena a temperaturas que oscilan entre -80 °C y 25 °C, preferiblemente en el intervalo de 2-25 °C. Más preferiblemente, la temperatura es de 2 °C a 8 °C. Otro intervalo de temperatura preferido es de 15 °C a 25 °C. La composición seca del profármaco de polímero de rhGH de acuerdo con la presente invención comprende el lioprotector trehalosa. El lioprotector se añade preferiblemente a la composición antes de la etapa de secado en una "cantidad lioprotectora", lo que significa que, después del secado del profármaco de proteína en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, el profármaco de proteína conserva esencialmente su estabilidad e integridad física y química durante el secado y almacenamiento. Las composiciones secas del profármaco de polímero de rhGH de acuerdo con la presente invención pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes usados en composiciones parenterales se pueden clasificar como, por ejemplo, agentes tamponantes, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes anti-adsorción, agentes de protección contra la oxidación u otros agentes auxiliares. Sin embargo, en algunos casos, un excipiente puede tener funciones dobles o triples. La composición seca puede contener uno o más de uno de los siguientes excipientes:

(i) Agentes tamponantes: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un intervalo deseado,

tales como fosfato de sodio, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad de tamponamiento se puede ajustar para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH

(ii) Modificadores de isotonicidad: para minimizar el dolor que puede resultar del daño celular debido a diferencias de presión osmótica en el depósito de inyección. La glicerina y el cloruro de sodio son ejemplos. Las concentraciones eficaces se pueden determinar mediante osmometría usando una osmolalidad supuesta de 285-315 mOsmol/kg para el suero

(iii) Conservantes: las preparaciones parenterales multidosis requieren la adición de conservantes a una concentración suficiente para minimizar el riesgo de que los pacientes se infecten tras la inyección y se han establecido los requisitos reglamentarios correspondientes. Los conservantes habituales incluyen m-cresol, fenol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato fenilmercúrico, timerosol, ácido sórbico, sorbato de potasio, ácido benzoico, clorocresol y cloruro de benzalconio

(iv) Estabilizantes: la estabilización se consigue mediante el refuerzo de las fuerzas estabilizadoras de la proteína, mediante la desestabilización del estado desnaturalizado o mediante la unión directa de excipientes a la proteína. Los estabilizantes pueden ser aminoácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, azúcares tales como glucosa, sacarosa, trehalosa, polioles tales como glicerol, manitol, sorbitol, sales tales como fosfato de potasio, sulfato de sodio, agentes quelantes tales como EDTA, hexafosfato, ligandos tales como iones metálicos divalentes (zinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas tales como derivados fenólicos. Además, pueden usarse oligómeros o polímeros tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, PEG o PVP o protamina o HSA

(v) Agentes anti-adsorción: principalmente tensioactivos iónicos o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles se usan para recubrir o adsorberse competitivamente a la superficie interna de la composición o del recipiente de la composición. Por ejemplo, poloxámero (Pluronic F-68), éter dodecílico de PEG (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilenglicol, PEG-polihistidina, BSA y HSA y gelatinas. La concentración elegida y el tipo de excipiente dependen del efecto a evitar, pero normalmente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfaz justo por encima del valor de CMC

(vi) Crioprotectores: durante el secado por congelación o por pulverización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizantes causados por la ruptura del enlace de hidrógeno y la eliminación de agua. Para este fin, pueden usarse azúcares y polioles, pero también se han observado efectos positivos correspondientes para tensioactivos, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trehalosa es particularmente eficiente en la reducción de la agregación inducida por humedad y también mejora la estabilidad térmica potencialmente causada por la exposición de los grupos hidrófobos de la proteína al agua. También se pueden usar manitol y sacarosa, bien como lió/crioprotector único o combinados entre sí, donde se sabe que proporciones más altas de manitol:sacarosa potencian la estabilidad física de una proteína en una composición seca. El manitol también se puede combinar con trehalosa. La trehalosa también se puede combinar con sorbitol o el sorbitol puede ser utilizado como único protector. También se pueden usar derivados de almidón o almidón

(vii) Agentes de protección contra la oxidación: antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monoglicérol, morina, polietilenoimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico

(viii) Otros agentes auxiliares: tales como agentes humectantes, modificadores de la viscosidad, antibióticos. Los ácidos y bases como el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio son agentes auxiliares necesarios para el ajuste del pH durante la fabricación.

En una divulgación, la composición seca del profármaco de polímero de rhGH se proporciona como una única dosis, lo que significa que el recipiente que comprende la composición seca del profármaco de polímero de rhGH comprende una dosis terapéutica.

Por lo tanto, en otra divulgación, la composición se proporciona como una composición de dosis única.

En otra divulgación, la composición seca del profármaco de polímero de rhGH contiene múltiples dosis, lo que significa que el recipiente que comprende la composición seca del profármaco de polímero de rhGH contiene más de una dosis terapéutica. Preferiblemente, una composición de dosis múltiple contiene al menos 2 dosis, tales como de 2 a 12 dosis de profármaco de polímero de hGH y preferiblemente al menos 4 dosis.

Por lo tanto, en otra divulgación, la composición se proporciona como una composición de dosis múltiple.

En una divulgación adicional, la composición contiene uno o más agentes biológicamente activos adicionales, bien en su forma libre o bien como un profármaco, y en la que el uno o más agentes biológicamente activos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en IGF-1, grelina o compuestos parecidos a la grelina, agonistas y/o análogos de la hormona liberadora de gonadotropina, factor y análogos de liberación de la hormona de crecimiento, esteroides gonadales, antiandrógenos, inhibidores de la aromatasa no esteroideos, terapia combinada contra el VIH, reguladores de ácidos grasos libres, esteroides anabólicos, agonistas/antagonistas de estrógenos, propranolol, supresores del apetito, fármacos contra la osteoporosis incluyendo bisfosfonatos, agentes para la formación de los huesos, estrógenos, hormonas paratiroides y moduladores selectivos del receptor, y/o fármacos antidiabéticos tales como insulina, tiazolidindionas, sulfonilureas, miméticos de la incretina, meglitinidas, biguanidas, inhibidores de la

5 alfa-glucosidasa y análogos de amilina. Los profármacos usados para agentes biológicamente activos adicionales son preferiblemente también profármacos de polímeros transitorios y especialmente profármacos tal como se describen en el presente documento para rhGH. Preferiblemente, los agentes biológicamente activos adicionales están contenidos en su forma libre. Antes de aplicar la composición seca de la composición del profármaco de polímero de rhGH a un paciente que lo necesite, la composición seca se reconstituye. La reconstitución puede llevarse a cabo en el recipiente en el que se proporciona la composición seca del profármaco de polímero de rhGH, tal como un vial, una jeringa, una jeringa de doble cámara, una ampolla y un cartucho, o la composición seca del profármaco de polímero de rhGH puede transferirse a un recipiente diferente y luego se reconstituye. La reconstitución se realiza agregando una cantidad predefinida de solución de reconstitución al liofilizado. Las soluciones de reconstitución son líquidos estériles, tales como el agua o un tampón, que pueden contener aditivos adicionales, tales como conservantes y/o antimicrobianos. Si la composición del profármaco de polímero de rhGH se proporciona como una dosis única, la solución de reconstitución puede contener uno o más de un conservante y/o antimicrobiano. Preferiblemente, es agua estéril. Si la composición del profármaco de polímero de rhGH es una composición de dosis múltiple, se prefiere que la solución de reconstitución contenga uno o más conservantes y/o antimicrobianos, tales como, por ejemplo, alcohol bencílico y cresol.

La composición reconstituida comprende

| | | |
|----|---|--------------|
| 20 | profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| | ácido succínico | 5-50 mM |
| | trehalosa dihidrato | 25-850 mg/ml |
| | y tiene un pH que varía de pH 4,5 a pH 5,5. | |

Más preferiblemente, la composición reconstituida comprende

| | | |
|----|---|--------------|
| 25 | profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| | ácido succínico | 5-50 mM |
| | trehalosa dihidrato | 30-150 mg/ml |
| | y tiene un pH que varía de pH 4,5 a pH 5,5. | |

Más preferiblemente, la composición reconstituida comprende

| | | |
|----|---|-------------|
| 30 | profármaco de polímero de rhGH | 30-60 mg/ml |
| | ácido succínico | 10 mM |
| | trehalosa dihidrato | 70-85 mg/ml |
| | y tiene un pH que varía de pH 4,5 a pH 5,5. | |

Opcionalmente, la composición reconstituida comprende uno o más conservantes y/o antimicrobianos. Opcionalmente, la composición reconstituida comprende uno o más excipientes. Después de la reconstitución, una composición de dosis única de profármaco de polímero de rhGH tiene un volumen de no más de 4 ml, tal como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5 ml. En una composición de dosis múltiple reconstituida de profármaco de polímero de rhGH, cada dosis tiene un volumen de no más de 4 ml, tal como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,5 ml. Las dosis terapéuticas individuales de dicha composición de dosis múltiple del profármaco de polímero de rhGH pueden usarse para diferentes pacientes que lo necesitan o pueden usarse para un paciente, mientras que después de la aplicación de la primera dosis, las dosis restantes se almacenan hasta que se necesiten. En el último caso, el profármaco de polímero de rhGH reconstituido es estable durante al menos 2 semanas, preferiblemente durante al menos 4 semanas, y más preferiblemente durante al menos 6 semanas, cuando se almacena a 2-8 °C. Preferiblemente, el profármaco de polímero de hGH se dosifica suficientemente en la composición para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de hGH durante al menos tres días en una aplicación. Más preferiblemente, la aplicación única del profármaco de polímero de hGH proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de hGH durante cuatro días, incluso más preferiblemente durante cinco días y aún más preferiblemente durante una semana.

En otro aspecto de la divulgación, la composición está comprendida en un recipiente, tal como un vial, una jeringa, una jeringa de doble cámara, una ampolla y un cartucho. Preferiblemente, el recipiente es una jeringa de doble cámara. Especialmente, la composición seca de acuerdo con la presente invención se proporciona en una primera cámara de la jeringa de doble cámara y se proporciona una solución de reconstitución en una segunda cámara de la jeringa de doble cámara.

El método de fabricación de la composición de la presente invención comprende las etapas de

(i) mezclar el profármaco de polímero de rhGH con trehalosa dihidrato y ácido succínico para producir una composición que comprende

| | |
|--------------------------------|--------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
|--------------------------------|--------------|

ácido succínico 5-50 mM

trehalosa dihidrato 25-850 mg/ml,

- 5 (ii) ajustar el pH de la composición de la etapa (i) a un pH que varía de pH 4,5 a pH 5,5 con tris,
 (iii) transferir cantidades de la mezcla de la etapa (i) equivalentes al número deseado de dosificaciones en cámaras adecuadas de un recipiente,
 (iv) secar la mezcla y
 (v) sellar el recipiente; mientras que el orden de las etapas (ii) y (iii) puede cambiarse.

Preferiblemente, la composición en la etapa (i) comprende

10 profármaco de polímero de rhGH 10-300 mg/ml
 ácido succínico 5-50 mM
 trehalosa dihidrato 50-100 mg/ml

Más preferiblemente, la composición en la etapa (i) comprende

15 profármaco de polímero de rhGH 30-60 mg/ml
 ácido succínico 10 mM
 trehalosa dihidrato 70-85 mg/ml.

El número de cámaras puede depender del número de dosis. Si solo se pretende una dosificación, el recipiente puede comprender una, dos o más cámaras. Preferiblemente, la etapa (iii) se realiza por liofilización.

20 Preferiblemente, en el método descrito anteriormente, el recipiente es una jeringa de doble cámara que tiene una primera cámara con la mezcla que comprende la composición del profármaco de polímero de hGH, comprendiendo el método además la etapa de

- llenar una segunda cámara con una solución de reconstitución antes de sellar el recipiente.

25 Otro aspecto es un kit de partes. En caso de que el dispositivo de administración sea simplemente una jeringa hipodérmica, el kit puede comprender entonces la jeringa, una aguja, un vial que contiene la solución de reconstitución y un vial o ampolla que contiene la composición seca de profármaco de polímero de hGH para su uso con la jeringa. Opcionalmente, el kit de partes comprende un dispositivo de seguridad para la aguja que se puede usar para tapar o cubrir la aguja tras el uso para prevenir lesiones. El dispositivo de inyección es diferente de una simple jeringa hipodérmica y, por lo tanto, el recipiente separado está adaptado para acoplarse con el dispositivo de inyección de manera que, durante el uso, la composición líquida en el recipiente está en comunicación fluida con la salida del dispositivo de inyección. Más preferiblemente, el recipiente separado es una jeringa de doble cámara. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, pero sin limitarse a estos, jeringas hipodérmicas y dispositivos inyectores de pluma. Los dispositivos de inyección particularmente preferidos son los inyectores de pluma en cuyo caso el contenedor es un cartucho, preferiblemente un cartucho desechable.

35 Un kit de partes comprende una aguja y un recipiente que contiene la composición de acuerdo con la presente invención y que opcionalmente contiene además una solución de reconstitución, estando adaptado el recipiente para su uso con la aguja. Preferiblemente, el recipiente es una jeringa de doble cámara.

40 Un aspecto adicional se refiere al método de administración de una composición de profármaco de polímero de rhGH reconstituida. La composición del profármaco de polímero de rhGH puede administrarse mediante métodos de inyección o infusión, que incluyen por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea e intraperitoneal. Un aspecto adicional es un método de preparación de una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH, uno o más lioprotectores y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en la que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero, comprendiendo el método la etapa de

- Poner en contacto la composición de la presente invención con una solución de reconstitución.

45 Otro aspecto es una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH, uno o más lioprotectores y opcionalmente uno o más excipientes

farmacéuticamente aceptables, en la que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero que se puede obtener por el método anterior.

5 En una divulgación, la composición seca del profármaco de rhGH de polímero no solo comprende un profármaco de polímero de rhGH, un lioprotector y, opcionalmente, uno o más excipientes, sino también otros restos biológicamente activos, en su forma libre o como profármacos. Tales restos biológicamente activos son, por ejemplo:

- IGF-1
- grelina o compuestos similares a la grelina,
- análogo de la hormona liberadora de gonadotropina tal como, por ejemplo, triptorelina o antiandrógeno, tal como, por ejemplo, acetato de ciproterona o inhibidores de aromatasa no esteroideos, tales como, por ejemplo, letrozol
- 10 – terapia combinada contra el VIH
- regulador de ácido graso libre, por ejemplo, acipimox
- esteroides anabólicos, por ejemplo, oxandrolona
- agonista/antagonista de estrógeno
- propranolol
- 15 – supresor del apetito, por ejemplo, sibutramina.

Si la composición seca del profármaco de polímero de hGH comprende otros restos biológicamente activos en forma de profármaco, entonces se prefiere que dichos otros restos biológicamente activos estén unidos transitoriamente a un polímero. También se prefiere que el enlace transitorio comprenda cualquiera de los enlazadores descritos anteriormente.

20 En una divulgación alternativa, la composición del profármaco de polímero de rhGH de acuerdo con la presente invención se combina con un segundo compuesto biológicamente activo de tal manera que el profármaco de polímero de rhGH se administre primero a un paciente que lo necesita, seguido por la administración del segundo compuesto. Como alternativa, la composición del profármaco de polímero de rhGH se administra a un paciente que lo necesita una vez que otro compuesto haya sido administrado al mismo paciente.

25 En una divulgación, la composición del profármaco de polímero de rhGH seco tiene la siguiente composición (sobre la base del peso total de la composición):

| | | |
|----|---|-------------------|
| 30 | profármaco de polímero de rhGH | 1,1-92,1 % (p/p) |
| | ácido succínico | 0,1-14,4 % (p/p) |
| | trehalosa, opcionalmente como dihidrato | 7,3-98,7 % (p/p) |
| | tris | 0,01-25,4 % (p/p) |

También se revela que la composición del profármaco de polímero de rhGH seco tiene la siguiente composición (sobre la base del peso total de la composición):

| | | |
|----|---|-------------------|
| 35 | profármaco de polímero de rhGH | 7,8-85,5 % (p/p) |
| | ácido succínico | 0,1-8,9 % (p/p) |
| | trehalosa, opcionalmente como dihidrato | 13,6-90,3 % (p/p) |
| | tris | 0,03-15,7 % (p/p) |

También se revela que la composición del profármaco de polímero de rhGH seco tiene la siguiente composición (sobre la base del peso total de la composición):

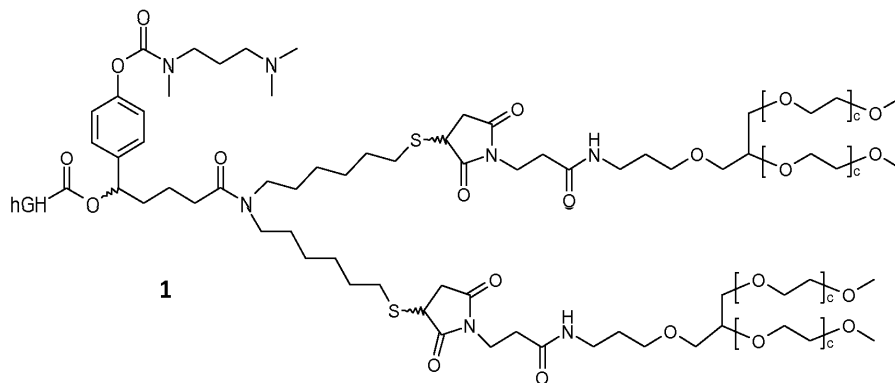
| | | |
|----|---|---------------------|
| 40 | profármaco de polímero de rhGH | 25,3-46,5 % (p / p) |
| | ácido succínico | 0,8-1,2 % (p/p) |
| | trehalosa, opcionalmente como dihidrato | 52,4-72,8 % (p/p) |
| | tris | 0,4-2,3 % (p/p) |

45 Preferiblemente, la composición del profármaco de polímero de rhGH tal como se describió anteriormente está liofilizada. Preferiblemente, se liofiliza en una primera cámara de una jeringa de doble cámara, de la cual la segunda cámara se llena con solución de reconstitución. En una realización, la solución de reconstitución es agua estéril que contiene 0,7-1,1 % de alcohol bencílico, más preferiblemente 0,9 % de alcohol bencílico. En otra realización, la solución de reconstitución contiene 0,2-0,4 % de cresol, más preferiblemente 0,3 % de cresol. Preferiblemente, la solución de reconstitución es agua estéril. Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente de profármacos de polímero de rhGH se usa para tratar o prevenir enfermedades o trastornos, que pueden tratarse mediante rhGH, tales como deficiencia de hormona de crecimiento (GHD), deficiencia de hormona de crecimiento de inicio en adultos, síndrome de Turner, síndrome de Prader-Willi, síndrome del intestino corto, insuficiencia renal crónica, talla pequeña para la edad gestacional (PEG), emaciación por SIDA, antienvjecimiento, artritis reumatoide, talla baja

idiopática, gen homeótico de la baja estatura y somatopausia. Se incluyen también la baja estatura asociada al uso prolongado de esteroides, el síndrome de Aarskog, entre otros. También se incluyen enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA (niños VIH/SLD); baja estatura en niños nacidos con muy bajo peso al nacer (MBPN) pero PEG; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; talla baja idiopática (TBI); 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 tendón o ligamento, por ejemplo, de la mano, rodilla u hombro; osteogénesis por elongación; trastornos resultantes del reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, en la cadera, el hombro, el codo, la muñeca o la mandíbula; trastornos que resultan de la fijación del material de osteosíntesis, tales como clavos, tornillos y placas; no unión o mala unión de fracturas; trastornos derivados de osteotomía, por ejemplo, de la tibia o del primer dedo del pie; trastornos derivados de la implantación de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla causada por traumatismo o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en varones; pacientes adultos en diálisis crónica (PADC); enfermedad cardiovascular asociada a desnutrición en PADC; reversión de la 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; alteración de la función hepática; varones con infecciones por VIH; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociada al VIH (SLD); infertilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor programada, desintoxicación de alcohol/drogas o traumatismo neurológico; envejecimiento; ancianos debilitados; osteoartritis; cartílago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; y baja estatura debido al tratamiento con glucocorticoides en niños. La Figura 1 muestra la estructura ejemplar 1 de tipo (AA1, AAA1), en la que la cadena de polímero de al menos 5 kDa de S⁰ que comprende G^a y BS¹ y BS² se marca como S⁰; el grupo carbamato resultante de L^a y el grupo amino primario de hGH se marca como L^a; BS¹ comprende la cadena polimérica de al menos 4 kDa marcada como S¹, en la que S¹ comprende BS³, que comprende la cadena polimérica de al menos 4 kDa marcada como S³. BS² comprende la cadena polimérica de al menos 4 kDa marcada como S².

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: síntesis del profármaco de polímero de hGH



El profármaco de polímero de hGH (1) con c~500 se sintetizó según se describe en el documento WO-A 2009/133137.

Ejemplo de referencia 2: ensayo de estabilidad de composiciones que contienen profármaco de polímero de hGH

Se prepararon cinco composiciones liofilizadas diferentes (C1, C2, C3, C4 y C5) del profármaco de polímero de hGH. Cada composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 5 mg/ml después de la reconstitución. Las formulaciones se colocaron en posición vertical en una incubadora ajustada a 40 °C/75 % de HR. Después de 17 días, se retiró un vial por formulación de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

ES 2 667 025 T3

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | pH | Trehalosa (mg/ml) | Manitol (mg/ml) | Glicina (mg/ml) |
|----|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|-----|-------------------|-----------------|-----------------|
| C1 | 5 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 4,0 | 92 | - | - |
| C2 | 5 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 4,0 | 10 | 40 | - |
| C3 | 5 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 4,0 | - | 46 | 20 |
| C4 | 5 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 6,0 | 10 | 40 | - |
| C5 | 5 | Fosfato (5 mM) | Hidróxido de sodio | 6,5 | 10 | 40 | - |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) |
|----|--|---|---|--|---|--|
| C1 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,15 (t=0); 0,35 (t=17 d) | 1,89 (t=0); 3,22 (t=17 d) | 1,75 (t=0); 2,79 (t=17 d) | 2,0 (t=0); 1,9 (t=17 d) | 1,25 (t=0); 1,64 (t=17 d) |
| C2 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,14 (t=0); 0,51 (t=17 d) | 1,82 (t=0); 5,68 (t=17 d) | 2,24 (t=0); 5,08 (t=17 d) | 1,8 (t=0); 1,8 (t=17 d) | 1,39 (t=0); 1,65 (t=17 d) |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) |
|----|--|---|---|--|---|--|
| C3 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,11 (t=0); 0,65 (t=17 d) | 1,79 (t=0); 8,69 (t=17 d) | 2,23 (t=0); 8,09 (t=17 d) | 2,0 (t=0); 2,3 (t=17 d) | 1,25 (t=0); 1,22 (t=17 d) |
| C4 | Torta blanca intacta /incolora, clara | 0,39 (t=0); 1,46 (t=17 d) | 1,59 (t=0); 2,16 (t=17 d) | 1,90 (t=0); 2,19 (t=17 d) | 2,6 (t=0); 2,8 (t=17 d) | 1,16 (t=0); 1,23 (t=17 d) |
| C5 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,47 (t=0); 1,04 (t=7 d) | 1,42 (t=0); 1,94 (t=17 d) | 1,69 (t=0); 1,71 (t=17 d) | 3,1 (t=0); 3,2 (t=17 d) | 1,94 (t=0); 1,90 (t=17 d) |

Ejemplo 3: ensayo de estabilidad de composiciones que contienen profármaco de polímero de hGH

5 Se prepararon tres composiciones liofilizadas diferentes (C6, C7 y C8) del profármaco de polímero de hGH. Cada composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 30 mg/ml después de la reconstitución. Las formulaciones se colocaron en posición vertical en una incubadora ajustada a 40 °C/75 % de HR y una incubadora ajustada a 2-8 °C, respectivamente. En cada punto temporal, se retiró un vial por formulación de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | pH | Trehalosa (mg/ml) |
|----|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|-----|-------------------|
| C6 | 30 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 4,0 | 92 |
| C7 | 30 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 5,0 | 92 |
| C8 | 30 | Fosfato (10 mM) | Hidróxido de sodio | 6,0 | 92 |

10

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre después de n semanas a 40 °C/75 % de HR, % del área integrada total para el pico de hGH libre | hGH libre después de n semanas a 2-8 °C, % del área integrada total para el pico de hGH libre |
|----|--|---|---|
| C6 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,4 (n=0); 0,6 (n=2); 0,7 (n=4); 0,9 (n=9) | 0,4 (n=0); 0,4 (n=4); 0,4 (n=9) |
| C7 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,6 (n=0); 0,9 (n=2); 1,0 (n=4); 1,4 (n=9) | 0,6 (n=0); 0,6 (n=4); 0,6 (n=9) |
| C8 | Torta blanca intacta/incolora, clara | 0,7 (n=0); 1,1 (n=2); 1,2 (n=4); 1,6 (n=9) | 0,7 (n=0); 0,7 (n=4); 0,7 (n=9) |

C6 y C8 son composiciones de referencia, no según la invención.

Ejemplo 4: prueba de estabilidad de las composiciones que contienen el profármaco de polímero de hGH

- 5 Se preparó una composición liofilizada (C9) de profármaco de polímero de hGH. La composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 30 mg/ml después de la reconstitución. La formulación se colocó en posición vertical en una incubadora ajustada a 40 °C/75 % HR. Después de cada punto de tiempo, se extrajo un vial de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | pH | Trehalosa dihidrato (mg/ml) |
|------------|---------------------------------------|-------------------------|------|-----|-----------------------------|
| C9 a 40 °C | 30 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 5,0 | 85 |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre, después de n semanas | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) (después de n semanas) | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) (después de n semanas) | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) (después de n semanas) | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) (después de n semanas) |
|--|--|---|--|---|--|---|
|--|--|---|--|---|--|---|

| | | | | | | |
|---------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| C9 a 40 °C | Torta blanca intacta, sin fracturas | 0,6 (n=0); | | | | |
| | alrededor del menisco, sin trozos sueltos, sin retroceso desde el vial | 0,9 (n=2); | 1,8 (n=2); | 0,8 (n=2); | 4,4 (n=2); | 2,1 (n=2); |
| | | 1,0 (n=4); | 2,0 (n=4); | 0,9 (n=4); | 4,2 (n=4); | 3,1 (n=4); |
| | | 1,4 (n=9) | 2,1 (n=9) | 1,2 (n=9) | 5,3 (n=9) | 3,2 (n=9) |

Ejemplo 5: ensayo de estabilidad de composiciones que contienen profármaco de polímero de hGH

5 Se preparó una composición liofilizada (C20) de profármaco de polímero de hGH. La composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 30 mg/ml después de la reconstitución. Las formulaciones se colocaron en posición vertical en una incubadora ajustada a 5 ± 3 °C y una incubadora ajustada a 25 ± 2 °C, respectivamente. Después de cada punto de tiempo, se extrajo un vial de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | Trehalosa dihidrato (mg/ml) | pH después de n meses |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------|------|-----------------------------|---|
| C20 a 5 °C | 30 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 85 | 5,1 (n=0); 5,1 (n=1); 5,0 (n=3); 5,0 (n=4); 5,1 (n=6); 5,1 (n=9); 4,9 (n=12); 5,1 (n=15); 5,1 (n=18); |
| C20 a 25 °C | 30 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 85 | 5,1 (n=0); 5,1 (n=1); 5,1 (n=3); 5,0 (n=4); 5,1 (n=6); |

ES 2 667 025 T3

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | Trehalosa dihidrato (mg/ml) | pH después de n meses |
|--|---------------------------------------|--------|------|-----------------------------|---|
| | | | | | 5,0 (n=9); 5,0 (n=12); 5,0 (n=15); 5,0 (n=18); |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre después de n meses | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses |
|------------------|--|--|--|---|--|---|
| C20 a 5 °C | Torta blanca intacta/incolora, clara | 1,4 (n=0); | 1,9 (n=0); | 0,8 (n=0); | 4,0 (n=0); | 2,9 (n=0); |
| | | 1,4 (n=1); | 1,9 (n=1); | 0,7 (n=1); | 4,0 (n=1); | 3,4 (n=1); |
| | | 1,4 (n=3); | 1,8 (n=3); | 0,8 (n=3); | 3,9 (n=3); | 2,7 (n=3); |
| | | 1,4 (n=4); | 1,8 (n=4); | 0,8 (n=4); | 4,0 (n=4); | 2,5 (n=4); |
| | | 1,4 (n=6); | 1,9 (n=6); | 0,7 (n=6); | 4,0 (n=6); | 2,5 (n=6); |
| | | 1,4 (n=9); | 1,6 (n=9); | 1,9 (n=9); | 3,9 (n=9); | 2,5 (n=9); |
| | | 1,5 (n=12); | 1,9 (n=12); | 1,2 (n=12); | 5,1 (n=12); | 2,7 (n=12); |
| | | 1,4 (n=15); | 1,8 (n=15); | 1,3 (n=15); | 3,9 (n=15); | 2,7 (n=15); |
| | | 1,4 (n=18) | 1,8 (n=18) | 1,4 (n=18) | 3,9 (n=18) | 2,9 (n=18) |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre después de n meses | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n meses |
|-------------------|--|--|--|---|--|---|
| C20 a 25 °C | Torta blanca intacta/incolora, clara | 1,4 (n=0); | 1,9 (n=0); | 0,8 (n=0); | 4,0 (n=0); | 2,9 (n=0); |
| | | 1,4 (n=1); | 1,9 (n=1); | 0,7 (n=1); | 4,3 (n=1); | 3,3 (n=1); |
| | | 1,5 (n=3); | 1,9 (n=3); | 0,8 (n=3); | 4,0 (n=3); | 3,1 (n=3); |
| | | 1,5 (n=4); | 1,9 (n=4); | 0,9 (n=4); | 4,0 (n=4); | 2,7 (n=4); |
| | | 1,5 (n=6); | 2,0 (n=6); | 0,8 (n=6); | 3,9 (n=6); | 2,7 (n=6); |
| | | 1,7 (n=9); | 1,8 (n=9); | 1,0 (n=9); | 3,8 (n=9); | 2,7 (n=9); |
| | | 1,7 (n=12); | 2,1 (n=12); | 1,5 (n=12); | 4,8 (n=12); | 2,9 (n=12); |
| | | 1,7 (n=15); | 2,1 (n=15); | 1,7 (n=15); | 3,8 (n=15); | 3,1 (n=15); |
| | | 1,7 (n=18) | 2,3 (n=18) | 1,6 (n=18) | 4,4 (n=18) | 3,3 (n=18) |

Ejemplo 6: Ensayo de estabilidad de composiciones que contienen profármaco de polímero de hGH

Se preparó una composición liofilizada (C10) de profármaco de polímero de hGH. La composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 44 mg/ml después de la reconstitución. Las formulaciones se colocaron en posición vertical en una incubadora ajustada a 40 ± 2 °C a una humedad relativa de 75 ± 5 %. Después de cada punto de tiempo, se extrajo un vial de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | pH | Trehalosa (mg/ml) |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|------|-----|-------------------|
| C10 | 44 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 5,0 | 75 |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre, después de n semanas | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas |
|-----|--|---|--|---|--|---|
| C10 | Torta blanca intacta, sin fracturas alrededor del menisco, sin trozos sueltos, sin retroceso desde el vial | 0,3 (n=0); 0,7 (n=4); 1,1 (n=8); | 1,7 (n=0); 2,0 (n=4); 2,2 (n=8) | 1,1 (n=0); 1,2 (n=4); 1,3 (n=8) | 4,8 (n=0); 4,8 (n=4); 4,8 (n=8) | 1, 9 (n=0); 2,0 (n=4); 2,1 (n=8) |

Ejemplo 7: Ensayo de estabilidad de composiciones que contienen profármaco de polímero de hGH

Se preparó una composición liofilizada (C11) de profármaco de polímero de hGH. La composición contenía cantidades del profármaco de polímero de hGH 1 para producir una concentración de 52 mg/ml después de la reconstitución. Las formulaciones se colocaron en posición vertical en una incubadora ajustada a 40 ± 2 °C a una humedad relativa de 75 ± 5 %. Después de cada punto de tiempo, se extrajo un vial de la incubadora respectiva, se reconstituyó con agua estéril para inyección y se sometió a análisis.

| | Profármaco de polímero de hGH (mg/ml) | Tampón | Base | pH | Trehalosa (mg/ml) |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|------|-----|-------------------|
| C11 | 52 | Ácido succínico (10 mM) | Tris | 5,0 | 74 |

| | Inspección visual antes/después de la reconstitución | hGH libre, % del área integrada total para el pico de hGH libre, después de n semanas | Isoaspartato para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Succinimida para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Desamidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas | Oxidación para el mapeo de péptidos (% de impurezas) después de n semanas |
|--|--|---|--|---|--|---|
|--|--|---|--|---|--|---|

| | | | | | | |
|-------------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| C11 a 40 °C | Torta blanca intacta, sin fracturas | 2,0 (n=0); | 1,3 (n=0); | 0,8 (n=0); | 4,2 (n=0); | 1,3 (n=0); |
| | alrededor del menisco, sin trozos sueltos, sin retroceso desde el vial | 2,6 (n=4); | 1,6 (n=4); | 1,0 (n=4); | 4,2 (n=4); | 1,5 (n=4); |
| | | 2,9 (n=8); | 1,7 (n=8) | 1,1 (n=8) | 3,9 (n=8) | 1,8 (n=8) |

Métodos:

5 Composiciones liofilizadas: se empleó ultra-/diafiltración o diálisis para obtener una solución acuosa concentrada que contenía el profármaco de polímero de hGH a partir del eluido de la columna. Se realizó un intercambio de tampón por tampón que contenía succinato o fosfato ajustado por pH con Tris o hidróxido de sodio, respectivamente, y trehalosa dihidrato y/o manitol y/o glicina para obtener una solución acuosa tamponada que contenía la concentración deseada de profármaco de polímero de hGH, que posteriormente se congeló y liofilizó.

10 RP-HPLC para detectar hGH libre: la fase móvil A estaba compuesta de TFA acuoso al 0,05 % (por ejemplo, 0,5 ml en 999,5 ml de agua de calidad HPLC) y la fase móvil B estaba compuesta de TFA al 0,04 % en acetonitrilo (por ejemplo, 0,4 ml de TFA en 999,6 ml de acetonitrilo). Se utilizó una columna Waters UPLC C18 BEH 300 Å de 1,7 µm de 2,1x50 mm. El caudal se ajustó a 0,4 ml/min, la detección se realizó a una longitud de onda de 215 nm, la temperatura de funcionamiento de la columna era de 30 °C (± 5 °C). La temperatura del enfriador de muestra se ajustó a 4 °C y la carga de inyección de la muestra era de 100 µg (10 µL de una muestra de 10 mg/ml). Las muestras se transfirieron a filtros centrífugos de PVDF de 0,22 µm (Millipore, #UFC30GVNB) y se filtraron por centrifugación durante 1 min a 9.000 x g. Las muestras filtradas se diluyeron a 10 mg/ml con tampón de formulación. Digestión trípica del profármaco de hGH polimérico y mapeo de péptidos: la digestión trípica de los conjugados de hGH se realizó a una relación de tripsina/hGH = 1:20 (p/p). El pH se ajustó con tampón de proteólisis concentrado a pH = 7,0 para minimizar la escisión de hGH del conjugado transitorio de hGH-PEG durante la digestión. Después de 8 h de incubación a 37 °C, la digestión se detuvo mediante la adición de solución de ácido fosfórico al 5 % (p/p). La mezcla de péptidos resultante se separó mediante RP-HPLC en una columna C18 con un tamaño de poro de 300 Å y un diámetro de partícula de 1,7 µm. Se creó una combinación de gradientes con 0,05 % en volumen de TFA acuoso y TFA al 0,04 % en acetonitrilo como eluyentes y la detección a 215 nm. Los fragmentos trípticos que se eluyeron con una resolución razonable se caracterizaron mediante EM-CL y se compararon con masas teóricas monoisotópicas. La cobertura de la secuencia de proteínas fue del 96 % (184 de 191 aminoácidos). Las impurezas se cuantificaron como péptidos trípticos en función de su área de pico respectiva con relación al área de pico del péptido trípico no modificado correspondiente. En las condiciones de digestión trípica y posterior RP-HPLC-EM, tanto el intermedio de succinimida como el isoaspartato podían cuantificarse para ASP130 del profármaco de polímero de hGH. En las condiciones de digestión trípica y posterior RP-HPLC-EM, la formación de aspartato resultante de la desamidación de ASN149 y ASN152 podía cuantificarse para el profármaco de polímero de hGH. En las condiciones de digestión trípica y posterior RP-HPLC-EM, la formación de aspartato resultante de la desamidación de ASN149 y ASN152 podía cuantificarse para el profármaco de polímero de hGH. En las condiciones de digestión trípica y posterior RP-HPLC-EM, la formación del producto de degradación de sulfóxido de MET 14 podía cuantificarse para el profármaco de polímero de hGH.

35 EM-CL: espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida
 PVDF - fluoruro de polivinilideno
 HR - humedad relativa
 RP-HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
 TFA - ácido trifluoroacético
 Tris - tris(hidroximetil)aminometano
 40 UPLC - cromatografía líquida de ultra- alto rendimiento

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ascendis Pharma AS

<120> Composición de hormona de crecimiento

<130> CPX66939PC

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

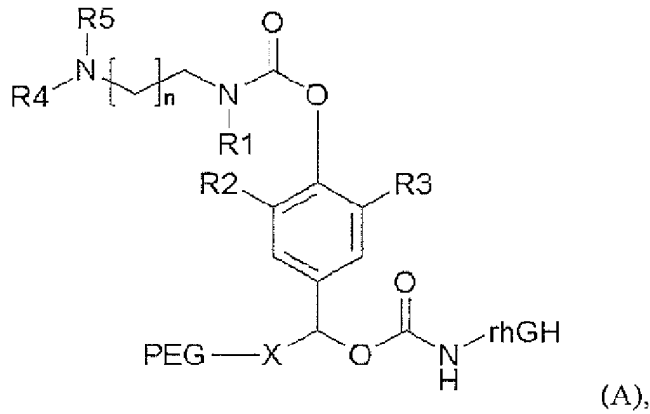
Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145          150          155          160

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

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

REIVINDICACIONES

1. Método de fabricación de una composición seca que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH y uno o más lioprotectores, en el que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero, teniendo el profármaco de polímero de rhGH la estructura química mostrada en (A),



en la que

HN-rhGH representa el residuo de rhGH unido al enlazador transitorio;
 R1, R2, R3, R4 y R5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario;
 PEG es un polímero de polietilenglicol soluble en agua que contiene al menos 50 % en peso de unidades de óxido de etileno unidas al enlazador transitorio;
 n = 1 o 2; y
 X se selecciona de alquilo C1 a C8 o heteroalquilo C1 a C12;

comprendiendo el método las etapas de

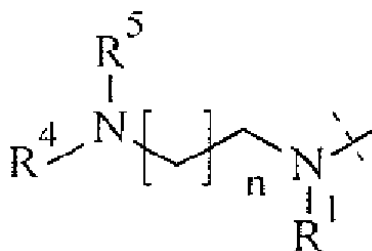
(i) mezclar el profármaco de polímero de rhGH con trehalosa dihidrato y ácido succínico para producir una composición que comprende

| | |
|--------------------------------|---------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| ácido succínico | 5-50 mM |
| trehalosa dihidrato | 25-850 mg/ml, |

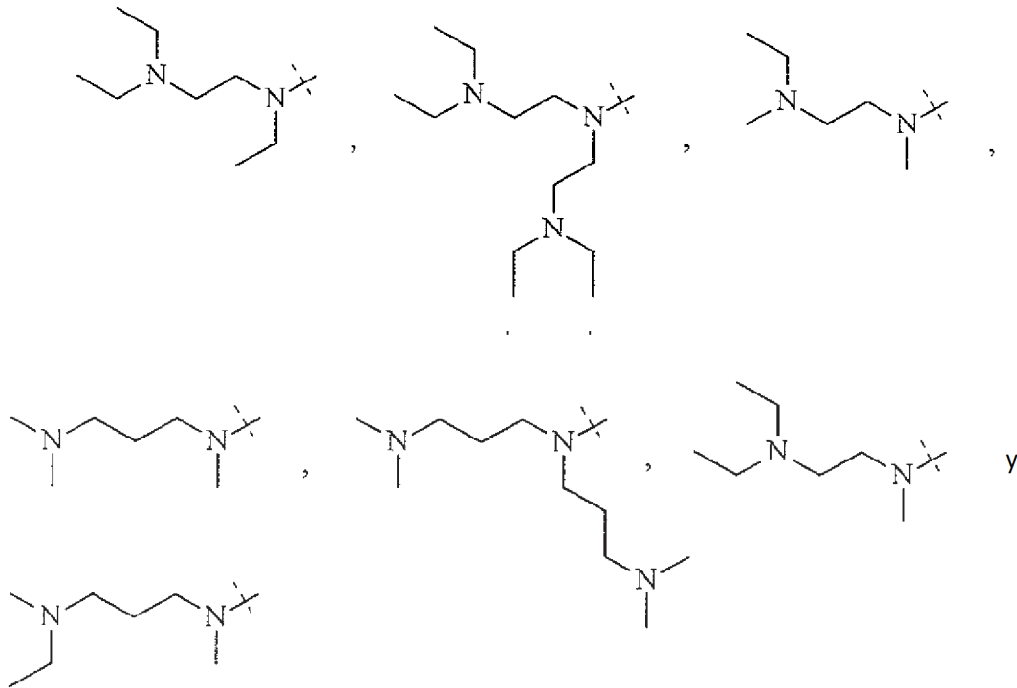
(ii) ajustar el pH de la composición de la etapa (i) a un pH que oscila entre pH 4,5 y pH 5,5 con tris,
 (iii) transferir cantidades de la mezcla de la etapa (i) equivalentes al número deseado de dosificaciones a cámaras adecuadas de un recipiente,
 (iv) secar la mezcla y
 (v) sellar el recipiente;

pudiendo el orden de las etapas (ii) y (iii) cambiarse.

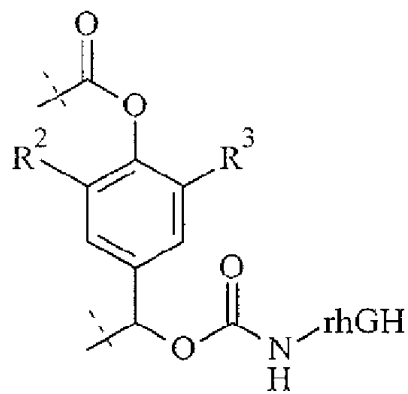
2. El método de la reivindicación 1, en el que el resto



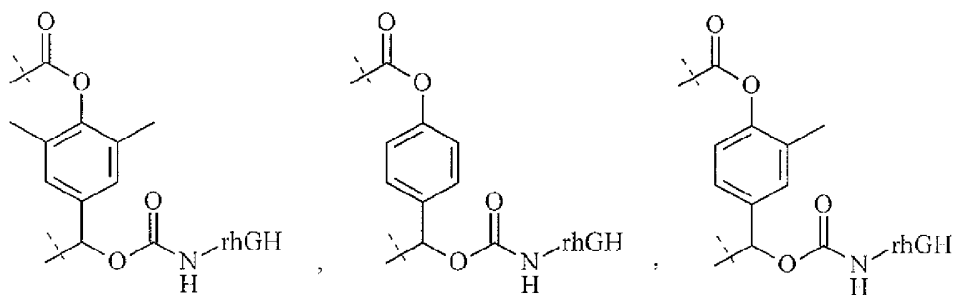
de fórmula (A) se selecciona del grupo que consiste en

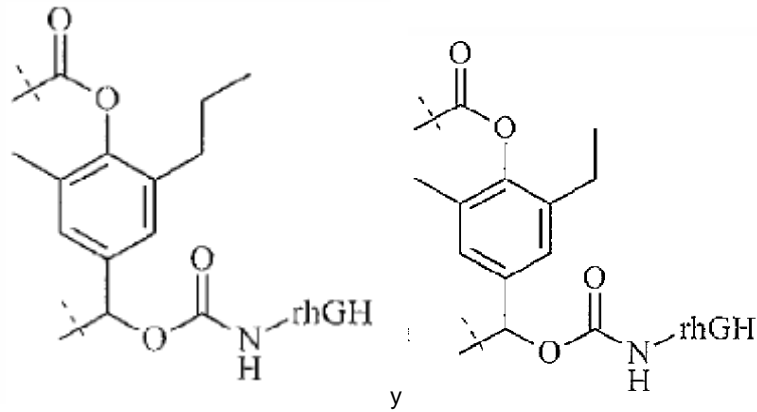


5 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el resto

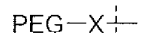


de fórmula (A) se selecciona del grupo que consiste en

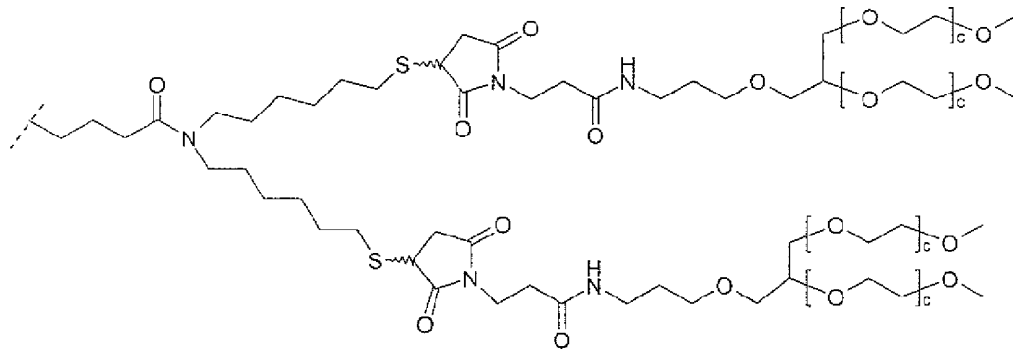




4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el resto



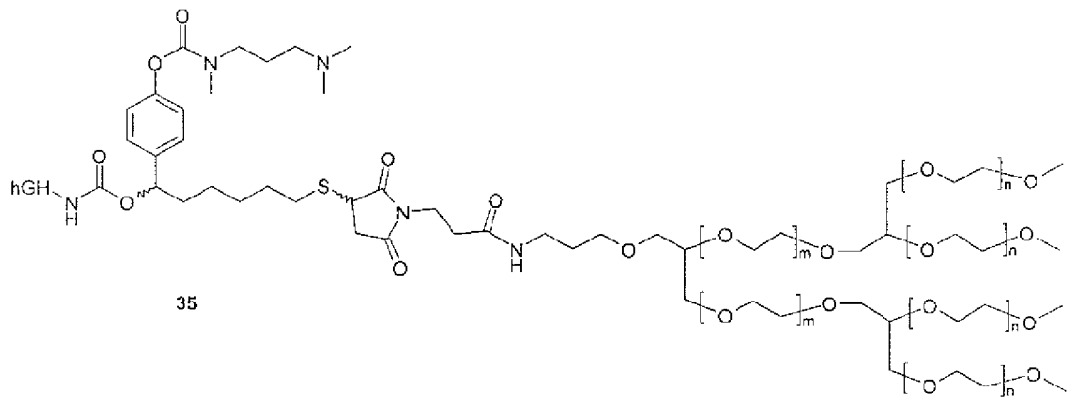
de fórmula (A) tiene la siguiente estructura



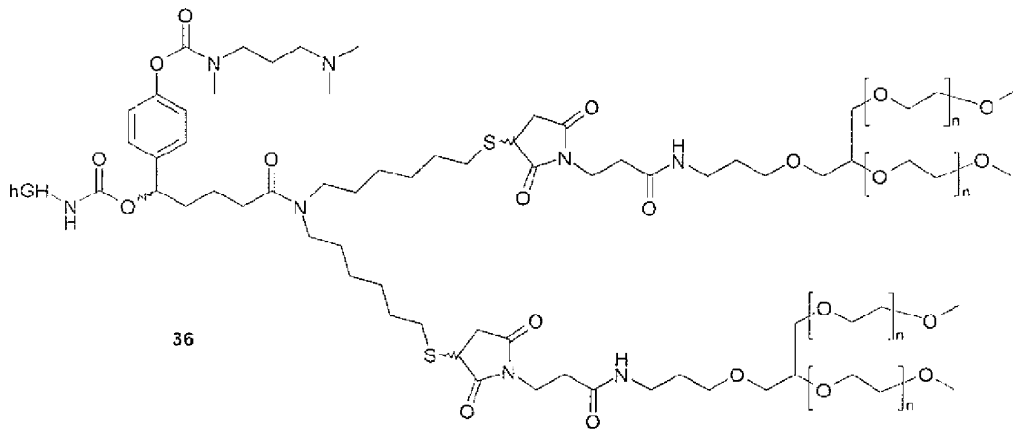
5

en la que cada c es independientemente un número entero de 250 a 750.

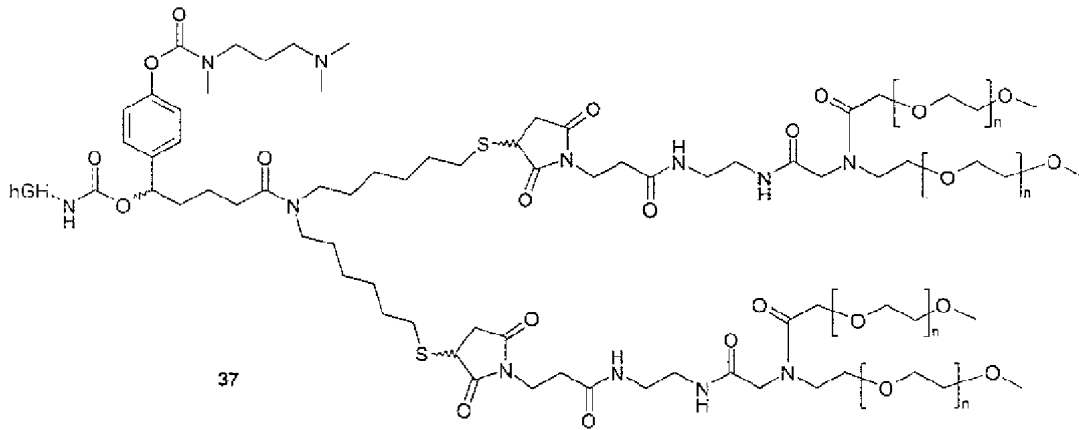
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el profármaco de polímero de hGH se selecciona del grupo que consiste en



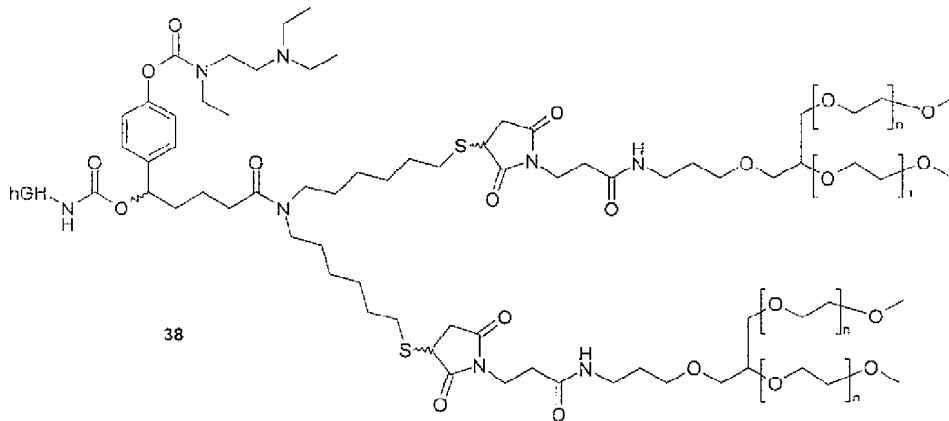
10 en el que m es un número entero de 200 a 250 y n es un número entero de 100 a 125;



en el que n es un número entero de 400 a 500;



en el que n es un número entero de 400 a 500; y



5

en el que n es un número entero de 400 a 500.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos el 30 % de todos los restos de la hormona de crecimiento de la composición están PEGilados en la posición Lys158.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición de la etapa (i) comprende

| | | |
|----|--|--|
| 10 | profármaco de polímero de rhGH ácido succínico trehalosa dihidrato | 10-300 mg/ml 5-50 mM 30-150 mg/ml. |
|----|--|--|

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición de la etapa (i) comprende

| | |
|--------------------------------|---------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| ácido succínico | 5-50 mM |
| trehalosa dihidrato | 50-100 mg/ml. |

5 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición de la etapa (i) comprende

| | |
|--------------------------------|--------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 30-60 mg/ml |
| ácido succínico | 10 mM |
| trehalosa dihidrato | 70-85 mg/ml. |

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa (iv) se realiza por liofilización.

10 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el recipiente es una jeringa de doble cámara que tiene una primera cámara con la mezcla, comprendiendo además el método la etapa de

- llenar una segunda cámara con una solución de reconstitución antes de sellar el recipiente.

15 12. Un método de preparación de una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH y uno o más lioprotectores, en el que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero, comprendiendo el método la etapa de

- realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que da como resultado una composición seca; y
- poner en contacto la composición seca con una solución de reconstitución,

en la que la composición reconstituida comprende

20

| | |
|--|--------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| ácido succínico | 5-50 mM |
| trehalosa dihidrato | 25-850 mg/ml |
| y tiene un pH que oscila de pH 4,5 a pH 5,5. | |

25 13. Una composición reconstituida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de polímero de rhGH y uno o más lioprotectores, en la que la hormona de crecimiento está unida transitoriamente a un portador de polímero, pudiendo obtenerse la composición por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. La composición reconstituida de la reivindicación 13, en la que la composición reconstituida comprende

30

| | |
|--|---------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 10-300 mg/ml |
| ácido succínico | 5-50 mM |
| trehalosa dihidrato | 30-150 mg/ml, |
| y tiene un pH que oscila de pH 4,5 a pH 5,5. | |

15. La composición reconstituida según la reivindicación 13 o 14, en la que la composición reconstituida comprende

35

| | |
|--|-------------|
| profármaco de polímero de rhGH | 30-60 mg/ml |
| ácido succínico | 10 mM |
| trehalosa dihidrato | 70-85 mg/ml |
| y tiene un pH que oscila de pH 4,5 a pH 5,5. | |

16. La composición reconstituida de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que la composición reconstituida también comprende uno o más conservantes y/o antimicrobianos.

40 17. La composición reconstituida de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que la solución de reconstitución es agua estéril que contiene 0,7-1,1 % de alcohol bencílico.

18. La composición reconstituida de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que la solución de reconstitución contiene 0,2-0,4 % de cresol.

19. La composición reconstituida de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que la composición

reconstituida comprende adicionalmente uno o más excipientes.

20. La composición reconstituida de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos seleccionados del grupo que consiste en deficiencia de hormona de crecimiento; deficiencia de hormona de crecimiento de inicio en adultos; síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi; síndrome del intestino corto; insuficiencia renal crónica; talla pequeña para la edad gestacional; emaciación por SIDA; antienvjecimiento; artritis reumatoide; talla baja idiopática; gen homeótico de la baja estatura; somatopausia; baja estatura asociada al uso prolongado de esteroides; síndrome de Aarskog; enfermedad renal crónica; artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística; infección por VIH en niños que reciben tratamiento TARGA; baja estatura en niños nacidos con muy bajo peso al nacer pero pequeños para la edad gestacional; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; talla baja idiopática; deficiencia de hormona de crecimiento en adultos, fracturas en o de huesos largos; fracturas en o de huesos esponjosos; pacientes después de una cirugía de tendón o ligamento; osteogénesis por elongación; trastornos resultantes del reemplazo de cadera o disco; reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis; trastornos que resultan de la fijación de material de osteosíntesis; no unión o mala unión de fracturas; trastornos derivados de osteotomía; trastornos derivados de la implantación de injertos; degeneración del cartilago articular en la rodilla causada por traumatismo o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en varones; pacientes adultos en diálisis crónica; enfermedad cardiovascular asociada a desnutrición en pacientes adultos en diálisis crónica; reversión de la caquexia en pacientes adultos en diálisis crónica; cáncer en pacientes adultos en diálisis crónica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en pacientes adultos en diálisis crónica; VIH en pacientes adultos en diálisis crónica; pacientes adultos ancianos en diálisis crónica; enfermedad hepática crónica en pacientes adultos en diálisis crónica, síndrome de fatiga en pacientes adultos en diálisis crónica; enfermedad de Crohn; alteración de la función hepática; varones con infecciones por VIH; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociada al VIH; infertilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor programada, desintoxicación de alcohol/drogas o traumatismo neurológico; envejecimiento; ancianos debilitados; osteoartritis; cartilago dañado traumáticamente; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; y baja estatura debido al tratamiento con glucocorticoides en niños.

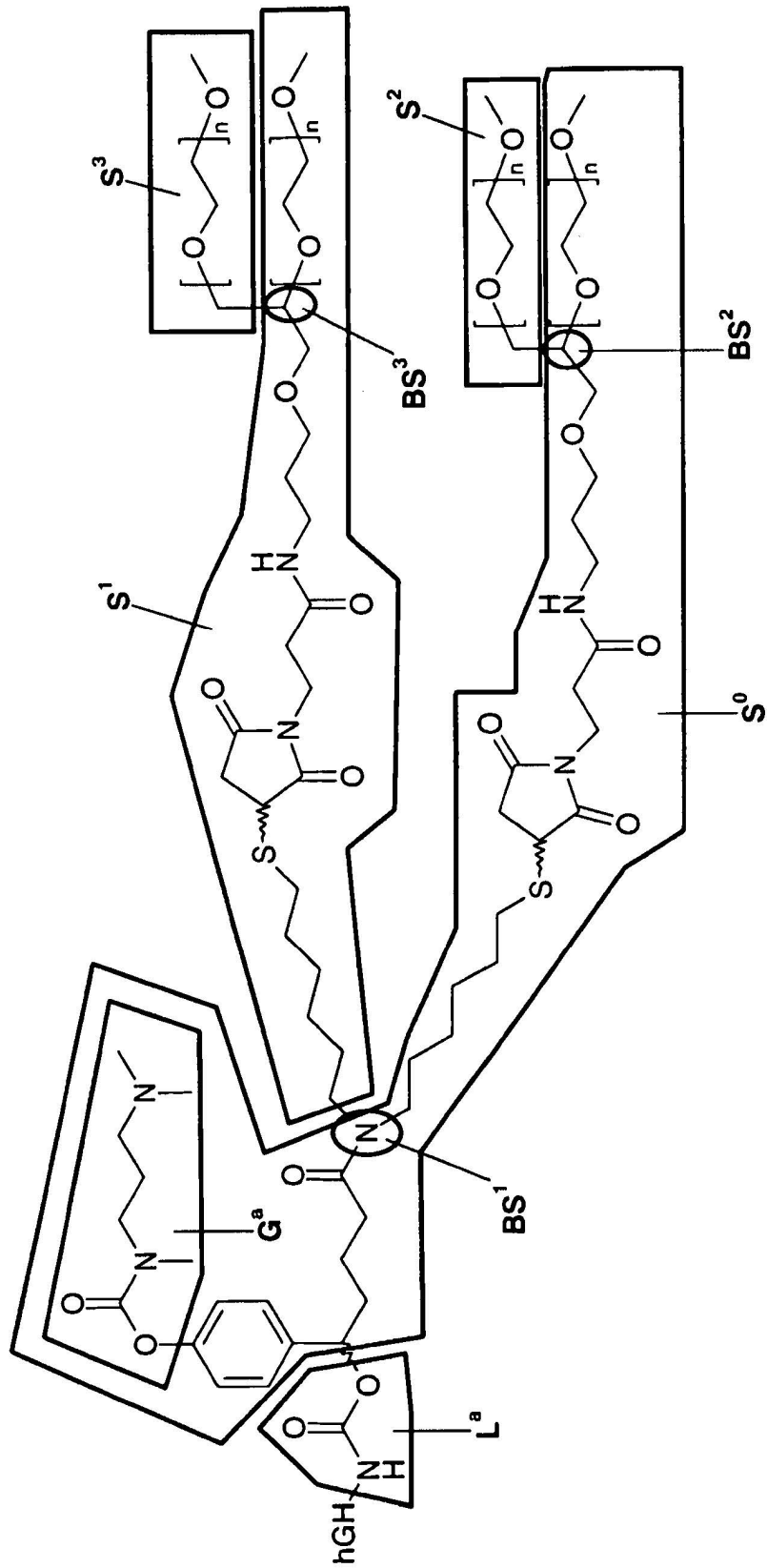


Fig. 1