

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 388**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61P 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/EP2010/061473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011 WO11015649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10743085 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2461831**

54 Título: **Hormonas de crecimiento con eficacia prolongada in vivo**

30 Prioridad:

06.08.2009 EP 09167350

11.08.2009 US 232967 P

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

08.03.2019

73 Titular/es:

NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (100.0%)

Thurgauerstrasse 36/38

8050 Zürich, CH

72 Inventor/es:

JOHANSEN, NILS, LANGELAND;

ANDERSEN, HENRIK, SUNE;

BUCHARDT, JENS;

BEHRENS, CARSTEN;

NØRSKOV-LAURITSEN, LEIF y

SU, JING

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 703 388 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

Hormonas de crecimiento con eficacia prolongada *in vivo*

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de hormona de crecimiento unido a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, y a métodos para la preparación y el uso de tales compuestos. Estos compuestos tienen un perfil de acción prolongado y son útiles en la terapia.

10

Antecedentes de la invención

Se conoce bien la modificación de las propiedades y características de los péptidos mediante la conjugación de grupos al péptido que cambian debidamente las propiedades del péptido. Dicha conjugación generalmente requiere que algún grupo funcional en el péptido reaccione con otro grupo funcional en un grupo de conjugación. Típicamente, los grupos amino, tales como el grupo amino N-terminal o el grupo ϵ -amino en las lisinas, se han usado en combinación con un reactivo de acilación adecuado tal como se describe para GLP-1 en el documento WO2005/027978. Alternativamente, el polietilenglicol (PEG) o derivados de este pueden unirse a las proteínas. Para una revisión, véase *Exp. Opin. Ther. Patent.*, 14, 859-894, (2004). Se ha demostrado que la unión de PEG a la hormona de crecimiento puede tener un efecto positivo sobre el tiempo de vida media en plasma de la hormona de crecimiento, documento WO 03/044056.

El uso de carboxipeptidasas para modificar el extremo C-terminal de los péptidos se ha descrito anteriormente. El documento WO 92/05271 describe el uso de carboxipeptidasas y compuestos nucleofílicos para amidar el grupo carboxilo del extremo C-terminal, y el documento WO 98/38285 describe variantes de carboxipeptidasa Y particulares adecuadas para este propósito.

El documento EP 243 929 describe el uso de carboxipeptidasa para incorporar polipéptidos, grupos reporteros o agentes citotóxicos en el extremo C-terminal de proteínas o polipéptidos.

El documento WO 2005/035553 describe métodos para la conjugación selectiva de péptidos mediante la incorporación enzimática de un grupo funcional en el extremo C-terminal de un péptido.

Previamente se ha usado la transglutaminasa para alterar las propiedades de los péptidos. En la industria alimenticia y en particular en la industria de lácteos están disponibles muchas técnicas por ejemplo para unir péptidos mediante el uso de transglutaminasas. Otros documentos describen el uso de transglutaminasa para alterar las propiedades de péptidos fisiológicamente activos. Los documentos EP 950665, EP 785276 y Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 487-504 (2002) describen la reacción directa entre péptidos que comprenden al menos una Gln y un PEG con grupo funcional amina o ligandos similares en presencia de transglutaminasa, y Wada, *Biotech. Lett.* 23, 1367-1372 (2001) describe la conjugación directa de β -lactoglobulina con ácidos grasos por medio de la transglutaminasa. La solicitud de patente internacional publicada como WO 2005/070468 describe el uso de transglutaminasa para incorporar un asidero donde pueden unirse grupos de conjugación. El documento WO2008/03750 describe compuestos de GH en donde un grupo 4-aminobenzoilo se une a la GH mediante aminación reductiva.

La hormona de crecimiento es una hormona fundamental implicada en la regulación no solo del crecimiento somático, sino además en la regulación del metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos. El efecto principal de la hormona de crecimiento es promover el crecimiento. La hormona de crecimiento humana es una proteína de 191 residuos de aminoácidos con la secuencia:

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTSPNREETQQKSNLELLRISL
LLIQSWLEPVQFLRSV FANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQYTSKFDNTSHNDDALLK
50 NYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (sec. con núm. de ident.: 1).

La administración de hormona de crecimiento humana y sus variantes estrechamente relacionadas se usa para tratar una variedad de enfermedades relacionadas con una deficiencia de la hormona de crecimiento. Dado que es un péptido, la hormona de crecimiento se administra parenteralmente, *es decir*, por medio de una aguja. La hormona de crecimiento, además, se caracteriza por un tiempo de vida media relativamente corto, por tanto se requieren administraciones frecuentes con el dolor correspondiente y la inconveniencia para el paciente. Por tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar compuestos de hormona de crecimiento con propiedades farmacológicas mejoradas, tal como *por ejemplo* un tiempo de vida media prolongado.

La presente invención proporciona novedosos conjugados de la hormona de crecimiento con propiedades farmacológicas mejoradas así como métodos para su producción.

Breve descripción de la invención

La biodisponibilidad de un compuesto farmacéutico administrado por vía subcutánea puede relacionarse con la velocidad de absorción. La capacidad de un compuesto de pasar por las uniones estrechas de los capilares

subcutáneos puede en parte estar relacionada con sus propiedades físicas y químicas así como el tamaño molecular o el volumen hidrodinámico del compuesto. Un conjugado proteico tal como una hGH pegilada (PEG-hGH) con un PEG de 40 kDa tiene un peso molecular aparente de 150 – 250 kDa. Una molécula de hGH con albúmina unida covalentemente tiene un peso molecular de 87 kDa, mientras que una molécula de hGH con una albúmina unida no covalentemente se disociará de la albúmina en parte del tiempo y por lo tanto tendrá un peso molecular de 22 kDa.

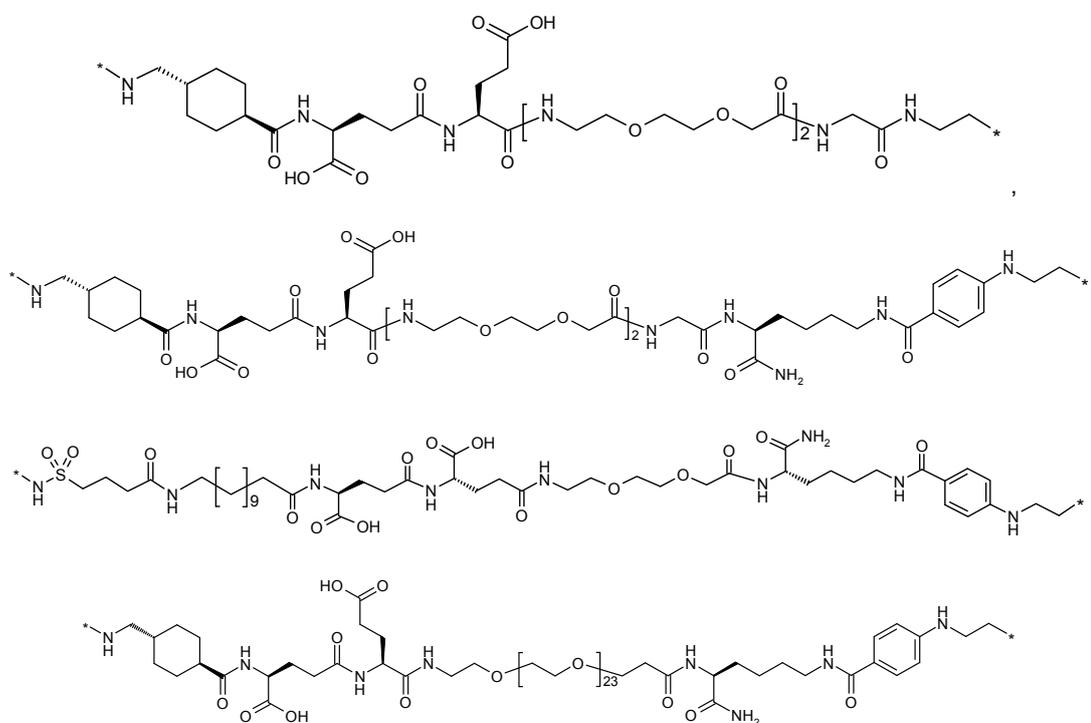
Se contempla que la cantidad de tiempo en el estado disociado depende, al menos en parte, de la afinidad del resto de unión de la albúmina. Por lo tanto la velocidad de absorción de una molécula de hGH con una albúmina unida no covalentemente puede ser más rápida que para una PEG-hGH. Un aumento de la velocidad de absorción puede obtenerse cuando se usan restos de unión a albúmina que tienen menor afinidad por la albúmina.

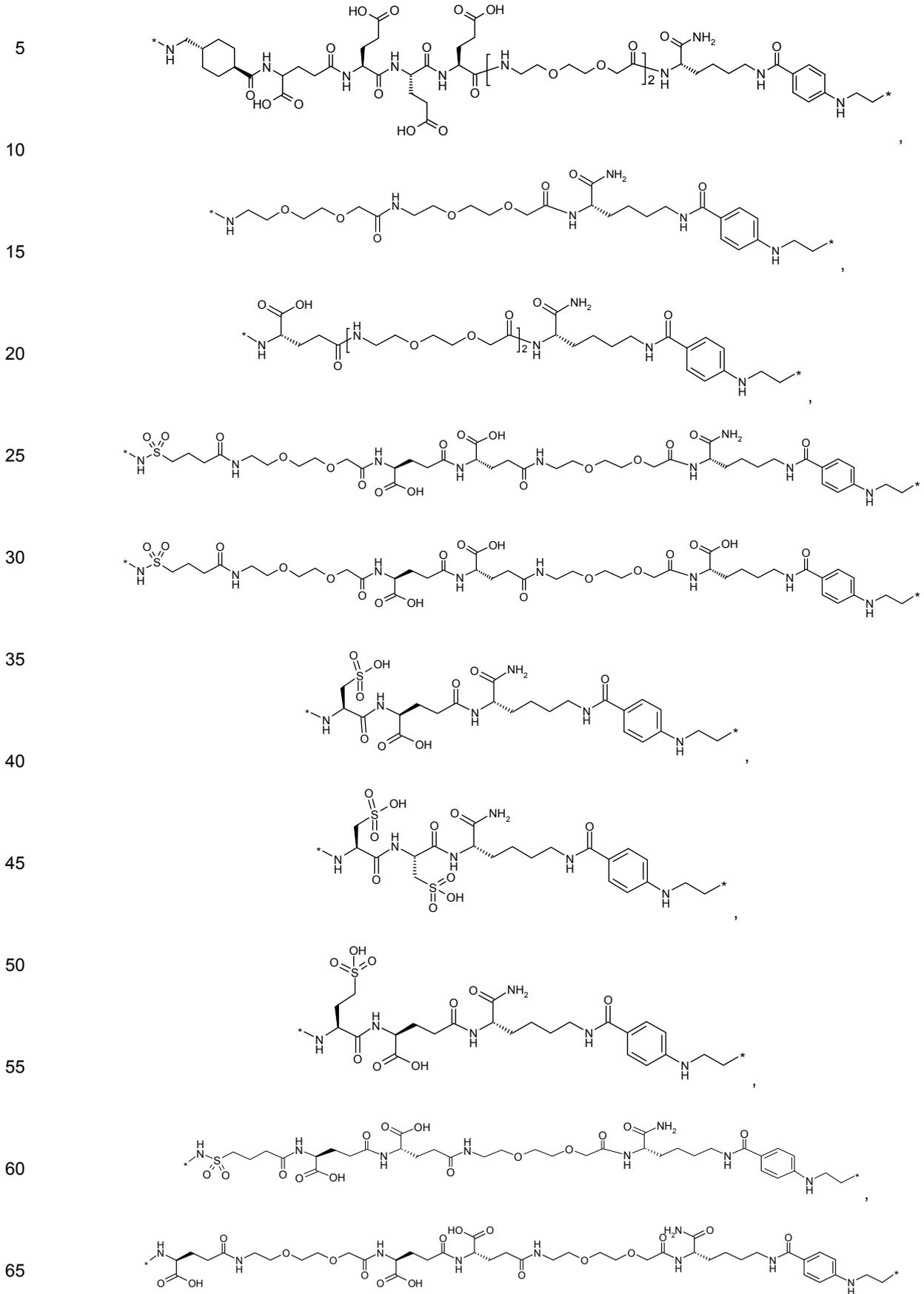
Adicionalmente, las propiedades físicas y químicas del enlazador y/o el espaciador que proporcionan la unión del resto de unión a la albúmina y la hGH influirán en las funcionalidades de los compuestos.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que los compuestos de hormona de crecimiento (GH) pueden unirse selectivamente a un residuo de unión a la albúmina - por medio de un espaciador hidrofílico que separa la GH y el residuo de unión a la albúmina con un resto químico que tiene un valor de $m\text{LogP} < 0$ – o un $c\text{LogP} < 0,5$ para obtener conjugados de GH con propiedades farmacológicas mejoradas.

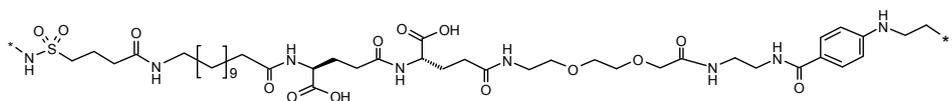
Además, la presente invención se basa en la observación de que la introducción de un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico en la hormona de crecimiento humana (hGH) puede realizarse selectivamente en donde puede conservarse una gran proporción de la actividad biológica. Preferentemente, un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se introduce en las posiciones correspondientes a las posiciones de fenilalanina 1, glutamina 40 y/o glutamina 141 en hGH que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.1. El uso de la transglutaminasa (TGasa), y en particular TGasa de *Streptovorticillium mobaraenae* o *Streptomyces lydicus* permite una introducción selectiva de un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico en las posiciones 40 y/o 141, y los restantes 11 residuos de glutamina se dejan sin modificar a pesar del hecho de que la glutamina es un sustrato para la transglutaminasa.

Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a un residuo de unión a la albúmina (A) por medio de un espaciador hidrofílico (B), en donde el espaciador hidrofílico (B) se selecciona de:

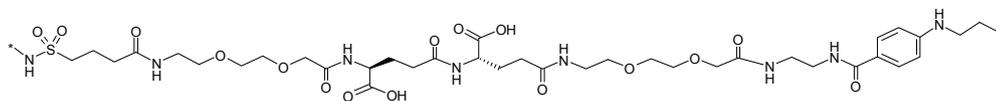




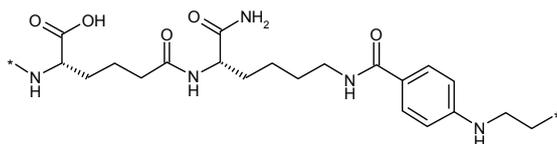
5



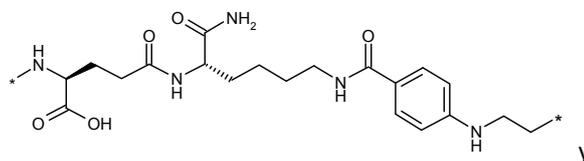
10



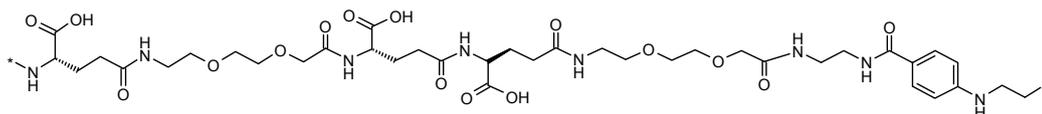
15



20



25



30

en donde * denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

35

Típicamente, el residuo de unión a la albúmina se une al extremo N-terminal, posición 40 o posición 141 de la hGH por medio de un espaciador hidrofílico. En modalidades adicionales dos o tres residuos de unión a la albúmina se unen al extremo N-terminal, posición 40 y/o posición 141 de la hGH por medio de un espaciador hidrofílico.

40

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para mejorar las propiedades de una GH mediante la conjugación de dicha proteína de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Definiciones

45

En el presente contexto, el término "compuesto de hormona de crecimiento" como se usa en la presente se refiere a una hormona de crecimiento de origen de mamífero, tal como una hormona de crecimiento humana, bovina o porcina, y una hormona de crecimiento recombinante, tal como una hormona de crecimiento recombinante humana, bovina o porcina, y variantes de tales hormonas de crecimiento. Como se usa en la presente "GH" y "compuesto de hormona de crecimiento" son intercambiables. Cuando la GH es una variante de una hormona de crecimiento de origen de mamífero, tal como hGH y hGH recombinante, se entiende que dicha variante es el compuesto obtenido mediante la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la hormona de crecimiento, por ejemplo secuencia, hGH, con otro aminoácido natural o no natural; y/o mediante la adición de uno o más aminoácidos naturales o no naturales a la hormona de crecimiento, por ejemplo, secuencia, hGH; y/o mediante la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la hormona de crecimiento, por ejemplo, secuencia, hGH, en donde cualquiera de estas etapas puede estar seguida, opcionalmente, por otra derivación de uno o más residuos de aminoácidos. En particular, tales sustituciones son conservadoras en el sentido de que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido del mismo grupo, *es decir* por otro residuo de aminoácido con propiedades similares. Los aminoácidos pueden dividirse convenientemente en los siguientes grupos sobre la base de sus propiedades: Aminoácidos básicos (como arginina, lisina, histidina), aminoácidos ácidos (como ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (como glutamina, cisteína y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (como leucina, isoleucina, prolina, metionina y valina), aminoácidos aromáticos (como fenilalanina, triptófano, tirosina) y aminoácidos pequeños (como glicina, alanina, serina y treonina). Típicamente, la GH tiene al menos 80 % de identidad con hGH, y típicamente, tiene al menos 20 % de la actividad de la hormona de crecimiento de la hGH según se determina en el ensayo I en la presente.

65

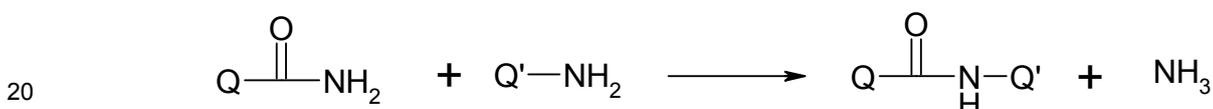
En el presente contexto, el término "residuo de unión a la albúmina" como se usa en la presente descripción significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina sérica humana. El residuo de unión a la albúmina unido al compuesto de hormona de crecimiento (GH) típicamente tiene una afinidad de unión hacia la albúmina sérica humana que está por debajo de aproximadamente 10 μM o incluso por debajo de aproximadamente 1 μM . Se conoce una

variedad de residuos de unión a la albúmina entre los restos lipofílicos lineales y ramificados que contienen 12-40 átomos de carbono, compuestos con un esqueleto de ciclopentanofenantreno, y/o péptidos que tienen 10-45 residuos de aminoácidos, etcétera. Las propiedades de unión a la albúmina pueden medirse por resonancia de plasmones superficiales como se describe en *J. Biol. Chem.* 277(38), 35035-35042, (2002).

5 El término "espaciador hidrofílico" como se usa en la presente descripción se refiere a un espaciador que separa un compuesto de hormona de crecimiento y un residuo de unión a la albúmina con un resto químico que comprende al menos 5 átomos que no son de hidrógeno, donde el 30-50 % de estos son N u O.

10 En el presente contexto, el término "transaminación" y términos relacionados indican una reacción en donde el nitrógeno de la amida en la cadena lateral de glutamina se intercambia con el nitrógeno de otro compuesto, en particular el nitrógeno de otro nucleófilo que contiene nitrógeno.

15 La transglutaminasa (E.C.2.3.2.13) también se conoce como proteína-glutamina-γ-glutamyltransferasa y cataliza la reacción general



25 Q-C(O)-NH₂ (aceptor de amina) puede representar un péptido o proteína que contiene un residuo de glutamina y Q'-NH₂ (donante de amina) representa un nucleófilo que contiene amina. Alternativamente, Q-C(O)-NH₂ y Q'-NH₂ pueden representar un aceptor de amina y un péptido o proteína que contiene lisina, respectivamente. En la presente invención, sin embargo, Q-C(O)-NH₂ representa una hormona de crecimiento que contiene un residuo de glutamina y Q'-NH₂ representa un nucleófilo que contiene amina según se indicó anteriormente.

30 Ejemplos de transglutaminasas útiles incluyen transglutaminasas microbianas, como por ejemplo las de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* y *Streptomyces griseocarneum* (todas descritas en el documento US 5,156,956), y de *Streptomyces lavendulae* (descrita en el documento US 5,252,469) y *Streptomyces ladakanum* (documento JP 2003/199569). Debe señalarse que los miembros del anterior género *Streptoverticillium* ahora se incluyen en el género *Streptomyces* (Kaempfer, *J. Gen. Microbiol.* 137, 1831-1892 (1991)). Otras transglutaminasas microbianas útiles se han aislado de *Bacillus subtilis* (descritas en el documento US 5,731,183) y de diversos Mixomicetos. Otros ejemplos de transglutaminasas microbianas útiles son las descritas en el documento WO 96/06931 (por ejemplo la transglutaminasa de *Bacillus lypidicus*) y el documento WO 96/22366. Las transglutaminasas no microbianas útiles incluyen la transglutaminasa hepática de cobayo, y las transglutaminasas de diversas fuentes marinas como el pargo japonés *Pagrus major* (descrita en el documento EP-0555649), y la ostra japonesa *Crassostrea gigas* (descrita en el documento US 5,736,356).

40 En el presente contexto, el término "no accesible" indica que algo está ausente o *de facto* ausente en el sentido de que no puede alcanzarse. Cuando se señala que los grupos funcionales no están accesibles en una proteína que se va a conjugar se entiende que indica que dicho grupo funcional está ausente de la proteína o, si está presente, de alguna manera está impedido de tomar parte en las reacciones. A manera de ejemplo, dicho grupo funcional puede tener una localización profunda en la estructura de la proteína de manera que está protegido de participar en la reacción. Se reconoce que si un grupo funcional está accesible o no depende de las condiciones de la reacción. Puede preverse que, *por ejemplo* en presencia de agentes desnaturizantes o a temperaturas elevadas la proteína puede desplegarse para exponer los grupos funcionales que de otra manera no están accesibles. Debe entenderse que "no accesible" se refiere a "no accesible en la condición de reacción elegida para la reacción de interés en particular".

50 El término "alcano" o "alquilo" indican un hidrocarburo saturado, lineal, ramificado y/o cíclico. A menos que se especifique con otro número de átomos de carbono, se entiende que el término indica hidrocarburos de 1 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como 1 a 20 (ambos incluidos), tal como de 1 a 10 (ambos incluidos), *por ejemplo* de 1 a 5 (ambos incluidos). Los términos alquilo y alquileo se refieren al radical y bi-radical correspondiente, respectivamente.

55 El término "C₁₋₆ alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono de manera inclusiva. Los ejemplos de tales grupos incluyen, metilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo y n-hexilo.

60 El término "C₃₋₁₀ cicloalquilo" típicamente se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoilo, y ciclodecanilo.

65 El término "alqueno" indica hidrocarburos lineales, ramificados y/o cíclicos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono. A menos que se especifique con otro número de átomos de carbono, se entiende que el término indica hidrocarburos con 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de

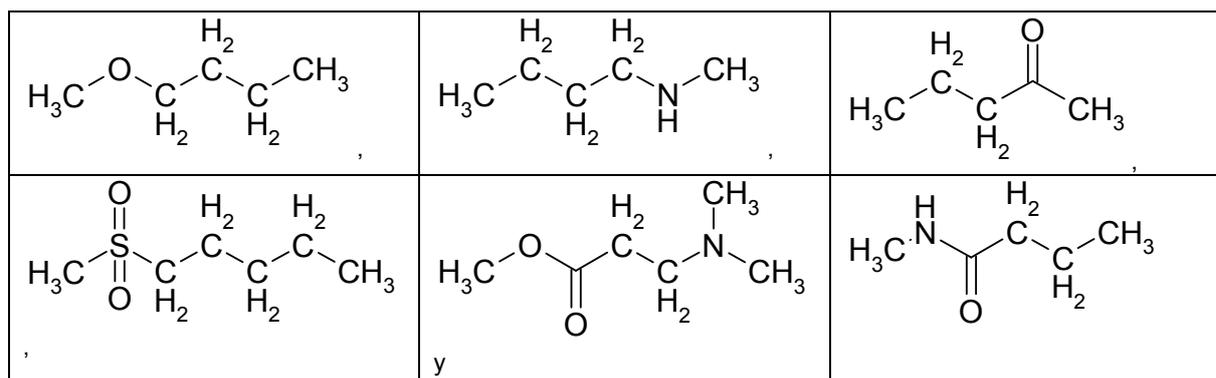
2 a 10 (ambos incluidos), *por ejemplo* de 2 a 5 (ambos incluidos). Los términos alquenilo y alquenileno se refieren al radical y bi-radical correspondiente, respectivamente.

El término “alquino” se entiende que indica hidrocarburos lineales, ramificados y/o cíclicos que comprenden al menos un triple enlace carbono-carbono, y puede comprender opcionalmente uno o más doble enlaces carbono-carbono. A menos que se especifique con otro número de átomos de carbono, se entiende que el término indica hidrocarburos con 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como de 2 a 20 (ambos incluidos), *por ejemplo* de 2 a 5 (ambos incluidos). Los términos alquinilo y alquinileno se refieren al radical y bi-radical correspondiente, respectivamente.

El término “compuesto aromático homocíclico” se entiende que indica hidrocarburos aromáticos, tal como benceno y naftaleno.

El término “compuesto heterocíclico” se entiende que indica un compuesto cíclico que comprende 5, 6 o 7 átomos en anillos de los cuales 1, 2, 3 o 4 son heteroátomos seleccionados de N, O y/o S. Los ejemplos incluyen compuestos aromáticos heterocíclicos, tal como tiofeno, furano, pirano, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isooxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, así como sus equivalentes hidrogenados parcial o completamente, como piperidina, pirazolidina, pirrolidina, pirolina, imidazolidina, imidazolina, piperazina y morfolina.

Los términos “hetero alcano”, “hetero alqueno” y “hetero alquino” se entiende que indican alcanos, alquenos y alquinos como se definió anteriormente, en los cuales uno o más hetero átomos o grupo se han insertado en la estructura de dichos restos. Los ejemplos de hetero grupos y átomos incluyen -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)- -C(S)- y -N(R*)-, en donde R* representa hidrógeno o C₁-C₆-alquilo. Los ejemplos de heteroalcanos incluyen.



Los términos “radical” o “birradical” se entiende que indican un compuesto del cual se han eliminado uno o dos, respectivamente, átomos de hidrógeno. Cuando se indica específicamente, un radical también puede indicar el resto formado por la eliminación formal de un grupo más grande de átomos, *por ejemplo* hidroxilo, a partir de un compuesto.

El término “halógeno” se entiende que indica los miembros del séptimo grupo principal de la tabla periódica, *por ejemplo* F, Cl, Br e I.

En el presente contexto, el término “arilo” se entiende que indica un radical de anillo aromático carbocíclico o un radical de un sistema de anillos aromáticos fusionados en donde al menos uno de los anillos es aromático. Los grupos arilo típicos incluyen fenilo, bifenililo, naftilo.

Los términos “heteroarilo” o “hetarilo”, como se usan en la presente, solos o en combinación, se refieren a un radical de anillo aromático con por ejemplo 5 a 7 átomos miembros, o a un radical de un sistema de anillos aromáticos fusionados con por ejemplo 7 a 18 átomos miembros, en donde al menos un anillo es aromático, que contiene uno o más heteroátomos como los átomos de anillos que se seleccionan de heteroátomos de nitrógeno, oxígeno o azufre, en donde los N-óxidos y monóxidos de azufre y dióxidos de azufre son sustituciones heteroaromáticas permisibles. Los ejemplos incluyen furanilo, tienilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, isotiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo e indazolilo.

El término “conjugado” como sustantivo indica una proteína modificada, *es decir* una proteína con un resto unido a ella para modificar las propiedades de dicha proteína. Como verbo, el término conjugado se entiende que indica el proceso de unir un resto a una proteína para modificar las propiedades de dicha proteína.

Como se usa en la presente, el término “profármaco” indica amidas biohidrolizables y ésteres biohidrolizables y además abarca a) compuestos en los que la funcionalidad biohidrolizable en un profármaco de este tipo se incluye en el compuesto de acuerdo con la presente invención, y b) compuestos que pueden oxidarse o reducirse biológicamente

a un grupo funcional determinado para producir sustancias farmacológicas de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de estos grupos funcionales incluyen 1,4-dihidropiridina, N-alquilcarbonil-1,4-dihidropiridina, 1,4-ciclohexadieno, *tert*-butilo.

5 Como se usa en la presente, el término "éster biohidrolizable" es un éster de una sustancia farmacológica (en este caso, un compuesto de acuerdo con la invención) que a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia original pero confiere propiedades ventajosas *in vivo* sobre esa sustancia tal como la duración de la acción, el inicio de la acción, o b) es biológicamente inactivo pero es convertido fácilmente *in vivo* al principio biológicamente activo por el sujeto. La ventaja es, por ejemplo, un aumento de la solubilidad o que el éster biohidrolizable se absorbe oralmente desde el intestino y se transforma a un compuesto de acuerdo con la presente invención en el plasma. Muchos ejemplos de estos se conocen en la técnica e incluyen a manera de ejemplo ésteres de alquilo inferiores (*por ejemplo*, C₁-C₄), ésteres de aciloxialquilo inferiores, ésteres de alcoxiaciloxialquilo inferiores, ésteres de alcoxiaciloxi, ésteres de alquil acilamino alquilo, y ésteres de colina.

15 Como se usa en la presente, el término "amida biohidrolizable" es una amida de una sustancia farmacológica (en este caso, un compuesto de acuerdo con la presente invención) que a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia original pero confiere propiedades ventajosas *in vivo* sobre esa sustancia tal como la duración de la acción, el inicio de la acción, o b) es biológicamente inactiva pero es convertida fácilmente *in vivo* al principio biológicamente activo por el sujeto. La ventaja es, por ejemplo, aumento de la solubilidad o que la amida biohidrolizable se absorbe oralmente desde el intestino y se transforma a un compuesto de acuerdo con la presente invención en el plasma. Muchos ejemplos de estas se conocen en la técnica e incluyen a manera de ejemplo alquil amidas inferiores, amidas de α -aminoácidos, alcoxiacil amidas y alquilaminoalquilcarbonil amidas.

25 En el presente contexto, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que no son dañinas para el paciente. Dichas sales incluyen sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquiladas. Las sales por adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos así como de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetileno salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico. Otros ejemplos de sales por adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables mencionadas en *J. Pharm. Sci.* 66, 2, (1977). Los ejemplos de sales metálicas incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio. Los ejemplos de sales de amonio y de amonio alquiladas incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio.

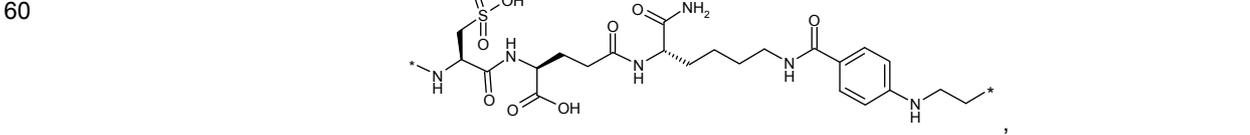
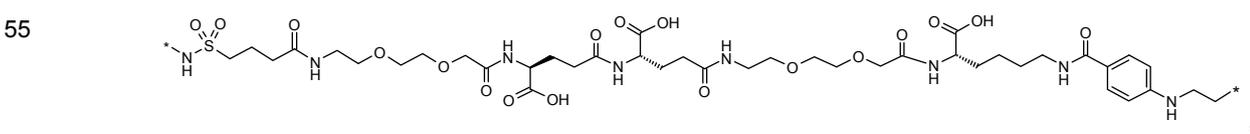
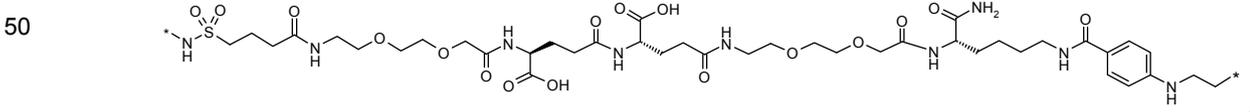
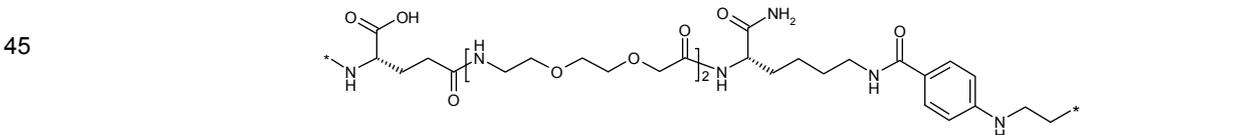
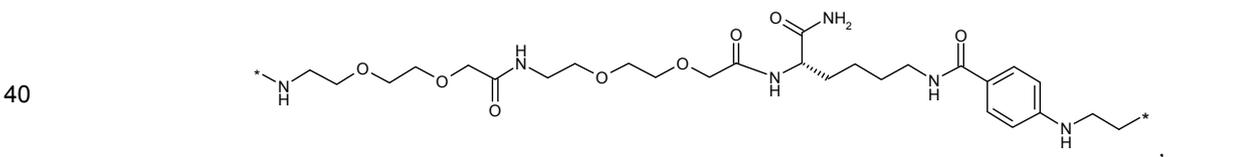
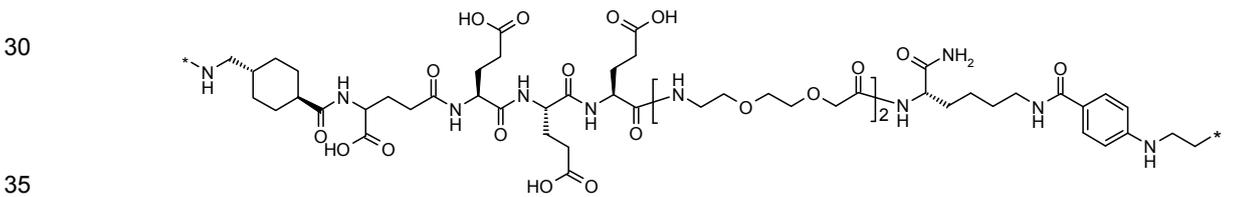
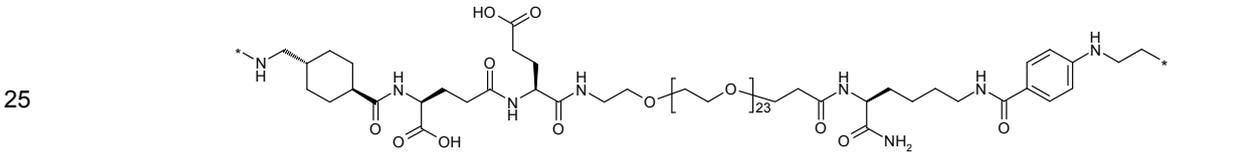
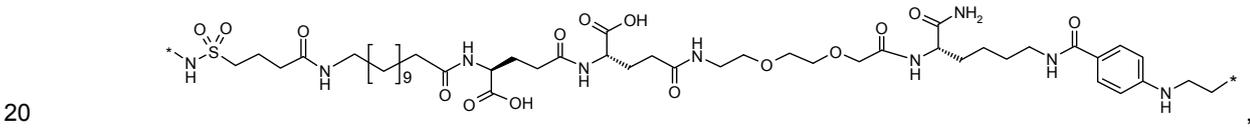
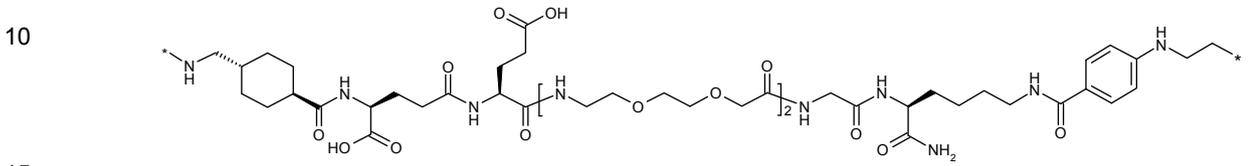
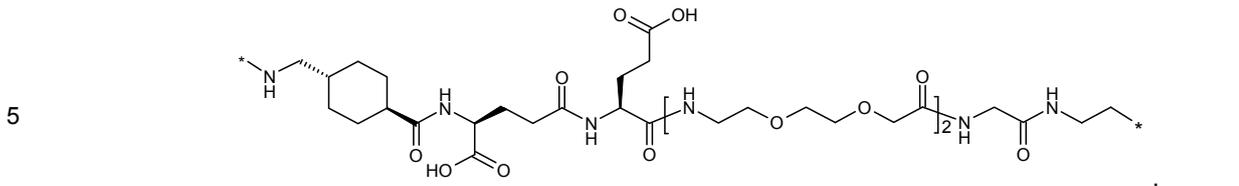
40 Una "cantidad con eficacia terapéutica" de un compuesto como se usa en la presente descripción se refiere a una cantidad suficiente para curar, aliviar, o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad con eficacia terapéutica". Las cantidades con eficacia para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como también del peso y estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación apropiada puede lograrse mediante el uso de la experimentación rutinaria, mediante la construcción de una matriz de valores y la evaluación de diferentes puntos en la matriz, lo que está dentro de las habilidades ordinarias de un médico o veterinario entrenado.

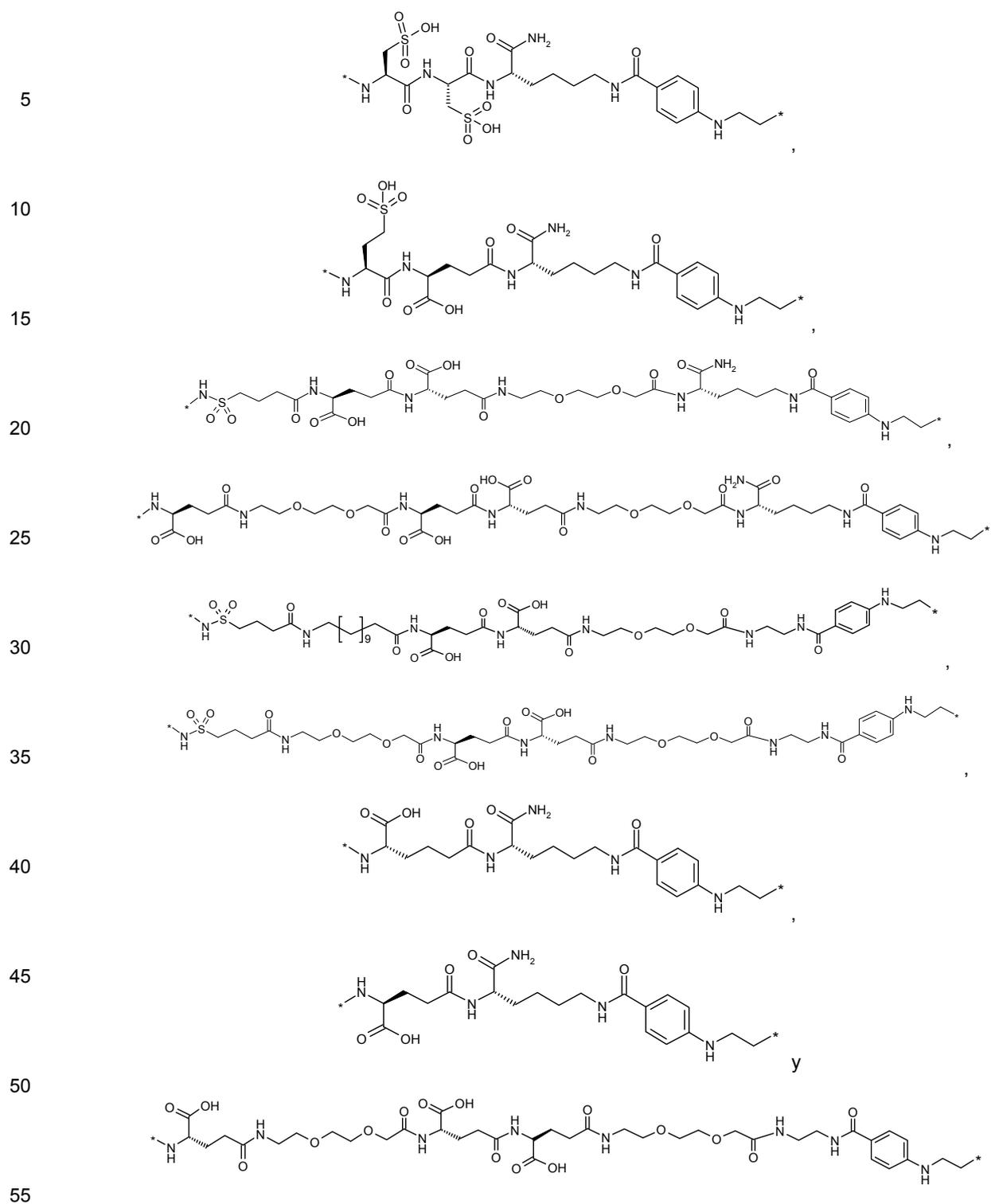
50 El término "tratamiento" y "tratar" como se usa en la presente descripción se refiere al manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. El término incluye el espectro completo de tratamientos para una afección determinada de la que padece el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o calmar los síntomas y complicaciones, y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección así como para prevenir la afección, en donde prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones. El paciente que va a tratarse es preferentemente un mamífero; en particular un ser humano, pero puede incluir, además, animales, como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos.

Descripción de la invención

60 La presente invención se refiere a un conjugado de una hormona de crecimiento que comprende un compuesto de hormona de crecimiento (GH) unido selectivamente a un residuo de unión a la albúmina (A) por medio de un espaciador hidrofílico (B), o una sal, solvato o profármaco de este farmacéuticamente aceptables, en donde B se selecciona de:

65





y en donde * denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

En una modalidad de la presente invención el espaciador hidrofílico tiene un valor de $m\text{LogP} < 0$. La solubilidad de un espaciador hidrofílico puede describirse mediante su valor de $\log P$. $\log P$, conocido además como el coeficiente de reparto, es el logaritmo de la relación de concentraciones de un compuesto en las dos fases de una mezcla de dos disolventes inmiscibles en equilibrio. Típicamente uno de los disolventes es agua mientras que el segundo se selecciona de octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y propilenglicol dipelargonato (PGDP). Los valores de $\log P$ medidos en estos disolventes diferentes muestran diferencias principalmente debido a los efectos de unión de hidrógeno. El octanol puede donar y aceptar enlaces de hidrógeno mientras que el ciclohexano es inerte. El cloroformo puede donar enlaces de hidrógeno

En otra modalidad de la invención, el espaciador hidrofílico tiene un LogP por debajo de -0,5 ya sea en octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y propilenglicol dipelargonato (PGDP).

5 En otra modalidad, el espaciador hidrofílico tiene un logP por debajo de -1 ya sea en octan-1-ol, cloroformo, ciclohexano y propilenglicol dipelargonato (PGDP).

10 Alternativamente, el valor de LogP puede calcularse como mLogP y/o cLogP para la parte de unión a la albúmina o la parte del espaciador hidrofílico mediante el uso de algoritmos publicados (*J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 5175-5180 "A New Substituent Constant, σ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski y otros. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1997) 3-25, "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" y I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, *Chem. and Pharm. Bull.*, 42 (1994) 976-978 "Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods". En una modalidad de la presente invención el espaciador hidrofílico tiene un cLogP < 0,5.

15 En otra modalidad el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico (B) como se define en las reivindicaciones.

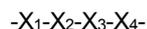
20 En otra modalidad el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a dos residuos de unión a la albúmina por medio de uno o dos espaciadores hidrofílicos (B) como se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, en un ejemplo un residuo de unión a la albúmina se une por medio de un espaciador hidrofílico a la glutamina en la posición 40 y el otro residuo de unión a la albúmina se une por medio de un espaciador hidrofílico a la glutamina en la posición 141; o alternativamente dos residuos de unión a la albúmina se unen por medio de un espaciador hidrofílico a la glutamina en la posición 40 o 141 o el extremo N-terminal. Todavía en otra modalidad el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a tres residuos de unión a la albúmina por medio de uno o más espaciadores hidrofílicos.

25 En una modalidad el espaciador hidrofílico comprende al menos un resto OEG, el radical de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico, es decir $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$. En otra modalidad específica el espaciador hidrofílico comprende al menos dos restos OEG. La orientación del (de los) resto(s) OEG de este tipo en una modalidad es de manera que $-\text{C}(\text{O})-$ está más cerca al compuesto de hormona de crecimiento pero no conecta con el compuesto de hormona de crecimiento y el enlazador de unión a la albúmina y $-\text{NH}-$ está más cerca al residuo de unión a la albúmina. En modalidades adicionales que comprenden dos restos OEG los dos restos tienen una orientación idéntica o una orientación diferente. En una modalidad dos de tales restos OEG se ubican adyacentes entre sí mientras que en modalidades alternativas tales restos OEG están separados por uno o más átomos unidos covalentemente.

35 En una modalidad el espaciador hidrofílico comprende al menos un residuo de ácido glutámico. El aminoácido ácido glutámico comprende dos grupos de ácido carboxílico. Su grupo gamma-carboxilo puede usarse para formar un enlace amida con el grupo épsilon-amino de lisina, o con un grupo amino de una molécula de OEG, si está presente, o con el grupo amino de otro residuo de Glu, si está presente. El grupo alfa-carboxilo puede usarse alternativamente para formar un enlace amida similar con el grupo épsilon-amino de lisina, o con un grupo amino de una molécula de OEG, si está presente, o con el grupo amino de otro residuo de Glu, si está presente. El grupo amino de Glu puede, a su vez, formar un enlace amida con el grupo carboxilo del residuo de unión a la albúmina, o con el grupo carboxilo de un resto de OEG, si está presente, o con el grupo gamma carboxilo o el grupo alfa carboxilo de otro Glu, si está presente. El enlace del grupo amino de un Glu con un grupo gamma carboxilo de un segundo Glu puede referirse como un resto "gamma-Glu".

45 En una modalidad el espaciador hidrofílico comprende al menos un resto OEG-Glu combinado $(-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-)$ o al menos un resto Glu-OEG combinado $(-\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-)$ o una combinación de estos, en donde tales restos Glu-OEG y OEG-Glu pueden separarse por uno o más átomos unidos covalentemente o unidos directamente entre sí por un enlace amida del Glu que forma un gamma-Glu.

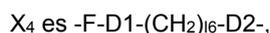
Se describe que el espaciador hidrofílico puede tener la fórmula



55 en donde



60 $\text{X}_2 \text{ es } -[(\text{CHR}^3)_{13}-\text{W}_4]_{m4}-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E}2]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-,$



65 I1, I2, I3, I4, I5 e I6 se seleccionan independientemente de 0-16,

m1, m3, m4, m6 y m7 se seleccionan independientemente de 0-10,

m2 y m5 se seleccionan independientemente de 0-25,

5 n1, n2, n3 y n4 se seleccionan independientemente de 0-16,

F es arilo, hetarilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia, en donde el arilo y

10 grupos hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, -CN, -OH, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo,

R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH,

15 -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-alquilo, arilo o hetarilo; en donde los grupos alquilo, arilo y hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN u -OH,

20 D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

25 W₁ a W₆ se seleccionan independientemente de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s1}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, o un enlace de valencia; en donde s1 es 0 o 1.

Se describe que D1 puede seleccionarse de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia,

30 D2 es -NR⁶-, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia y R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

Además se describe un conjugado de una hormona de crecimiento de la fórmula (I): A-W-B-GH(I)

en donde

35 GH representa un compuesto de hormona de crecimiento,

B representa un espaciador hidrofílico,

40 W es un grupo químico que une A y B, y

A representa un residuo de unión a la albúmina; y

45 sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de este.

Como se describió anteriormente el compuesto de hormona de crecimiento (GH) puede unirse a dos residuos de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, consecuentemente se describe adicionalmente un conjugado de una hormona de crecimiento de la fórmula (II):

50 A-W-B-GH-B'-W'-A'(II)

en donde

55 GH representa un compuesto de hormona de crecimiento,

W es un grupo químico que une A y B,

W' es un grupo químico que une A' y B',

60 A y A' representan independientemente un residuo de unión a la albúmina,

B y B' independientemente son espaciadores hidrofílicos, y

65 sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de este.

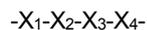
En el conjugado de fórmula (II) W' se selecciona de los mismos grupos que W, A' se selecciona de los mismos grupos que A y B' se selecciona de los mismos grupos que B, y debe entenderse que W y W', A y A', y B y B' se seleccionan independientemente de cualquiera de los grupos respectivos como se define a continuación. Por lo tanto, cualquiera de las modalidades de W, A, y B a continuación también son modalidades de W', A', y B'. Además, cualquiera de las modalidades descritas en la presente se refiere independientemente tanto a los conjugados de fórmula (I) y (II), así como el amplio aspecto y las modalidades de estos cuando sea adecuado.

En una modalidad GH es una variante de hGH, en donde una variante se entiende que es el compuesto obtenido mediante la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de hGH con otro aminoácido natural o no natural; y/o mediante la adición de uno o más aminoácidos naturales o no naturales a la secuencia de hGH; y/o mediante la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de hGH, en donde cualquiera de estas etapas puede opcionalmente estar seguida por una derivación adicional de uno o más residuos de aminoácidos. En particular, tales sustituciones son conservadoras en el sentido de que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido del mismo grupo, es decir por otro residuo de aminoácido con propiedades similares. Los aminoácidos pueden dividirse convenientemente en los siguientes grupos sobre la base de sus propiedades: Aminoácidos básicos (como arginina, lisina, histidina), aminoácidos ácidos (como ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (como glutamina, cisteína y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (como leucina, isoleucina, prolina, metionina y valina), aminoácidos aromáticos (como fenilalanina, triptófano, tirosina) y aminoácidos pequeños (como glicina, alanina, serina y treonina).

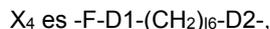
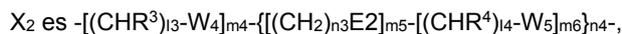
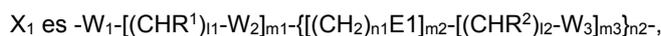
En otra modalidad GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (sec. con núm. de ident.:1). En modalidades adicionales, la GH tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 95 % de identidad con hGH. En modalidades adicionales, dichas identidades con hGH se asocian con al menos 20 %, tal como al menos 40 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 80 % de la actividad de hormona de crecimiento de la hGH según se determina en el ensayo I en la presente. Cualquiera de las modalidades de identidad de secuencia pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de actividad, tal como una GH que tiene al menos 80 % de identidad con hGH y se asocia con al menos 60 % de la actividad de hormona de crecimiento de la hGH; una GH que tiene al menos 90 % de identidad con hGH y se asocia con al menos 40 % de la actividad de hormona de crecimiento de la hGH; una GH que tiene al menos 95 % de identidad con hGH y se asocia con al menos 80 % de la actividad de hormona de crecimiento de la hGH, etcétera.

Aún en otra modalidad GH es hGH (sec. con núm. de ident.:1).

Se describe que el espaciador hidrofílico B puede tener la fórmula



en donde



l1, l2, l3, l4, l5 e l6 se seleccionan independientemente de 0-16,

m1, m3, m4, m6 y m7 se seleccionan independientemente de 0-10,

m2 y m5 se seleccionan independientemente de 0-25,

n1, n2, n3 y n4 se seleccionan independientemente de 0-16,

F es arilo, hetarilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia, en donde el arilo y

grupos hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, -CN, -OH, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo,

R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-alquilo, arilo o hetarilo; en donde los grupos alquilo, arilo y hetarilo opcionalmente se sustituyen con halógeno, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN u -OH,

D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

5 W₁ a W₆ se seleccionan independientemente de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, o un enlace de valencia; en donde s2 es 0 o 1.

10 En otra modalidad W₁ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₁ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

En otra modalidad W₂ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₂ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

15 En otra modalidad W₃ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₃ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

20 En otra modalidad W₄ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₄ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

En otra modalidad W₅ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₅ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

25 En otra modalidad W₆ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₆ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-,

30 En otra modalidad R¹ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH. Típicamente, R¹ se selecciona de -C(O)OH, -C(O)NH₂, o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, o -S(O)₂OH.

35 En otra modalidad R² se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH. Típicamente, R² se selecciona de -C(O)OH, -C(O)NH₂, o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, o -S(O)₂OH.

En otra modalidad R³ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH. Típicamente, R³ se selecciona de -C(O)OH, -C(O)NH₂, o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, o -S(O)₂OH.

40 En otra modalidad R⁴ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH. Típicamente, R⁴ se selecciona de -C(O)OH, -C(O)NH₂, o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, o -S(O)₂OH.

45 En otra modalidad R⁵ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH. Típicamente, R⁵ se selecciona de -C(O)OH, -C(O)NH₂, o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, o -S(O)₂OH.

En otra modalidad E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia. R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo.

50 En otra modalidad E1 se selecciona de -O- o -NR⁶- o un enlace de valencia. Típicamente, E1 se selecciona de -O-.

En otra modalidad E2 se selecciona de -O- o -NR⁶- o un enlace de valencia. Típicamente, E2 se selecciona de -O-.

55 En otra modalidad E1 y E2 son ambos -O-.

En otra modalidad E1 y E2 son ambos -NR⁶-.

En otra modalidad F es fenilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia.

60 En otra modalidad D1 se selecciona de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia.

En otra modalidad D1 se selecciona de -O- o -NR⁶- o un enlace de valencia. Típicamente, D1 se selecciona de -NR⁶.

En otra modalidad D2 se selecciona de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia.

65 En otra modalidad D2 se selecciona de -O- o -NR⁶- o un enlace de valencia. Típicamente, D2 se selecciona de -NR⁶.

R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

En otra modalidad I1 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

5 En otra modalidad I2 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad I3 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad I4 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

10 En otra modalidad I5 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad I6 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

15 En otra modalidad m1 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad m2 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En otra modalidad m3 es 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20 En otra modalidad m4 es 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad m5 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

25 En otra modalidad m6 es 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad m7 es 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

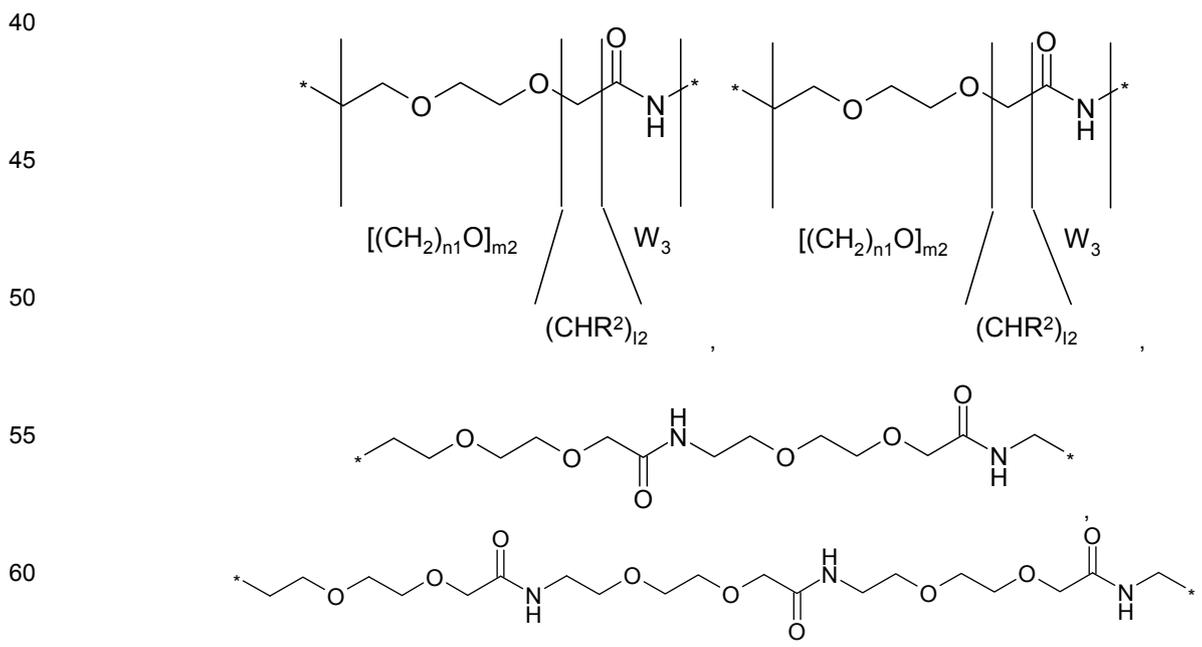
En otra modalidad n1 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

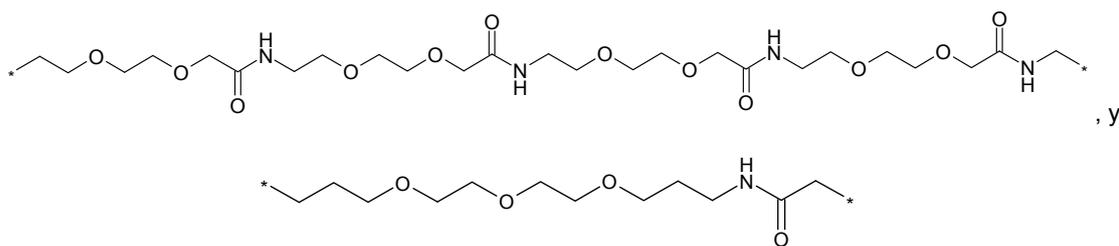
30 En otra modalidad n2 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad n3 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

35 En otra modalidad n4 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra modalidad X₁ es -W₁-[(CHR¹)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}O]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}]_{n2}- y X₂ es -[(CHR³)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}O]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}]_{n4}-, en donde -{[(CH₂)_{n1}O]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}]_{n2}- y -{[(CH₂)_{n3}O]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}]_{n4}- se seleccionan de,





en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

En otra modalidad el peso molar de dicho espaciador hidrofílico está en el intervalo de 80 Daltons (D) a 1500 D o en el intervalo de 500 D a 1100 D.

Aún en otra modalidad W tiene la fórmula

$-W_7-Y-$,

en donde

Y es $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8- o un enlace de valencia,

17 es 0-6,

W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$,

$-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s3$ es 0 o 1,

W_8 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s4$ es 0 o 1.

En una modalidad de W Y es $-(CH_2)_{17}$ -ciclohexil- W_8- .

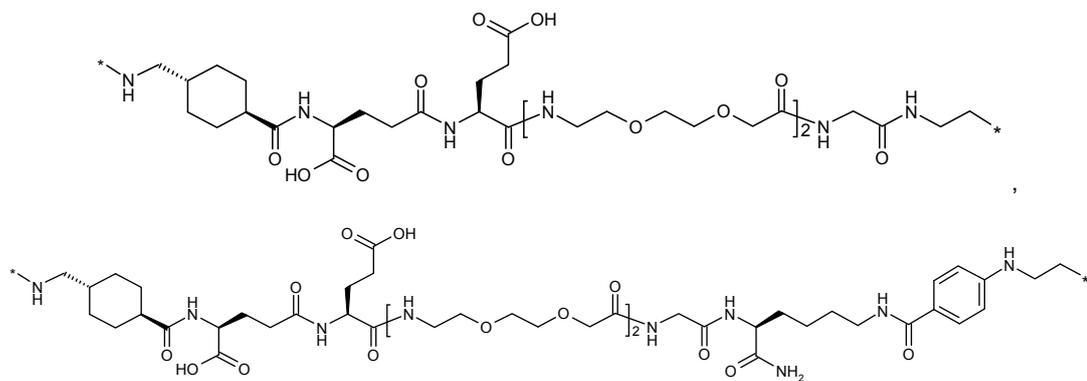
En otra modalidad Y es un enlace de valencia.

En una modalidad W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ o un enlace de valencia. Típicamente, W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$.

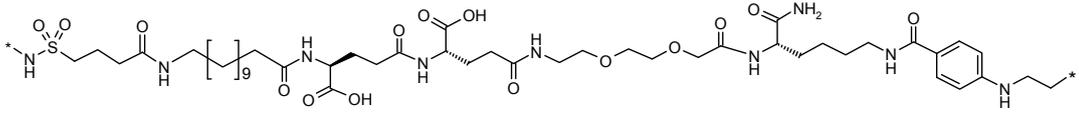
En otra modalidad W_8 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ o un enlace de valencia. Típicamente, W_8 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$.

En otra modalidad 17 es 0 o 1.

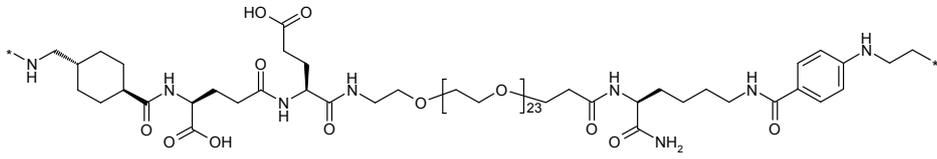
En otra modalidad el espaciador hidrofílico B de la presente invención se selecciona de



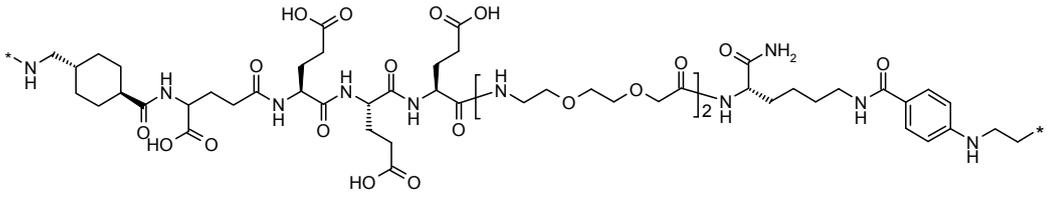
5



10

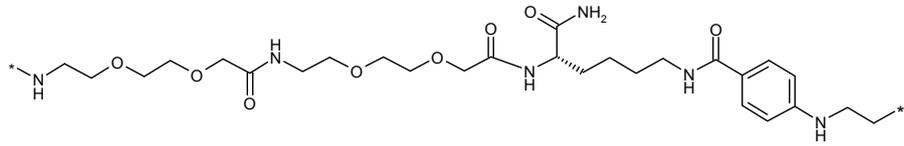


15

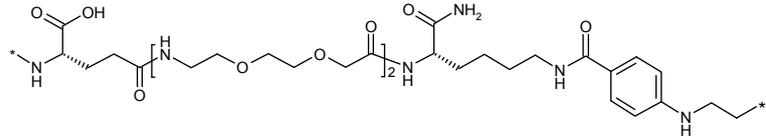


20

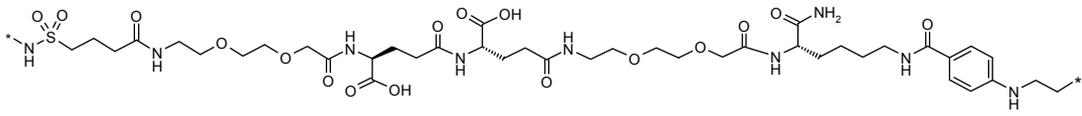
25



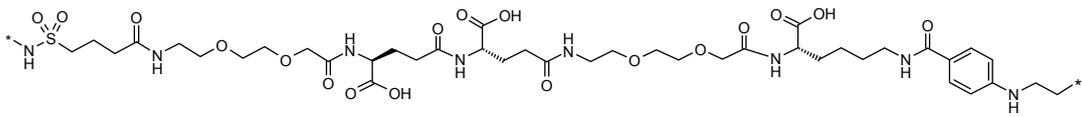
30



35

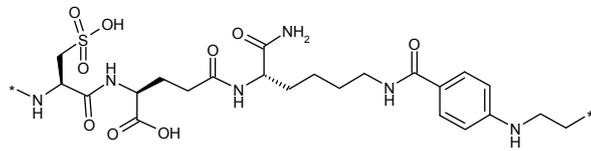


40

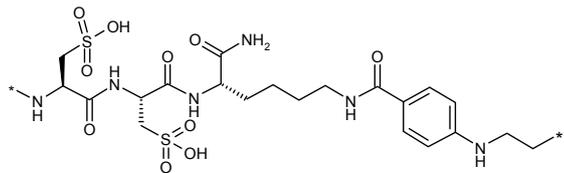


45

50

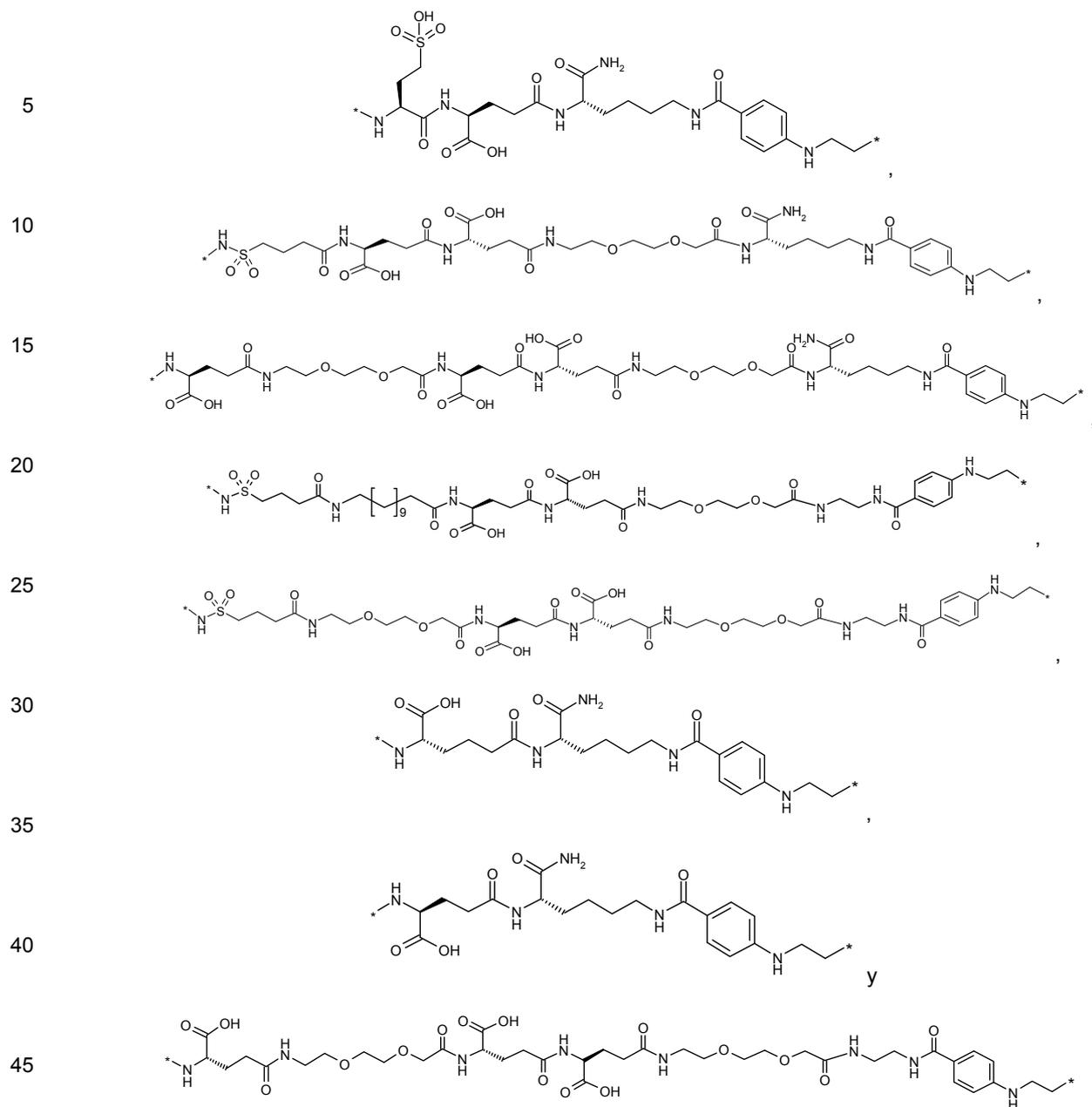


55



60

65



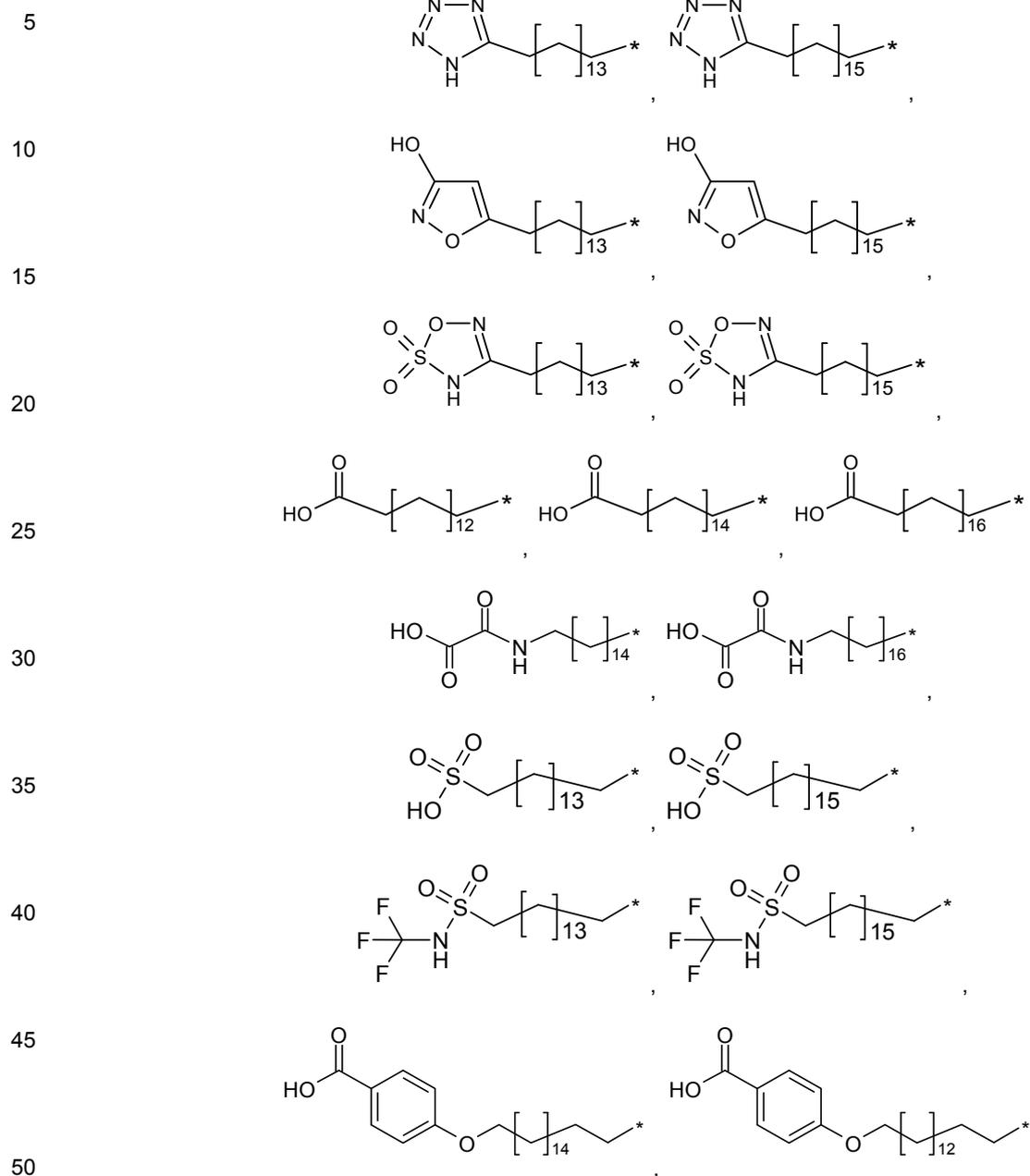
50 en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

El residuo de unión a la albúmina (sustituyente A en la fórmula (I) o (II) anterior) unido al compuesto de hormona de crecimiento de la presente invención es un residuo lipofílico, que se une no covalentemente a la albúmina. Típicamente, el residuo de unión a la albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico, y tiene una afinidad de unión hacia la albúmina sérica humana que está por debajo de aproximadamente 10 μM o incluso por debajo de aproximadamente 1 μM.

En otra modalidad del compuesto de la hormona de crecimiento de la presente invención el residuo de unión a la albúmina se selecciona de un grupo alquilo de cadena lineal, un grupo alquilo ramificado, un grupo que tiene un grupo de ácido ω-carboxílico o un isómero de ácido ω-carboxílico. Típicamente, el residuo de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono. En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina tiene de 8 a 26 átomos de carbono. En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina tiene de 8 a 20 átomos de carbono.

En otra modalidad A tiene de 14 a 26 átomos de carbono y comprende un grupo de ácido ω-carboxílico. En otra modalidad A tiene de 14 a 26 átomos de carbono y comprende un isómero de ácido ω-carboxílico, tal como un tetrazol.

En otra modalidad A se selecciona de



en donde * denota la unión a B a W.

55 El espaciador hidrofílico (B) se introduce preferentemente en una posición del compuesto de hormona de crecimiento (GH) de una manera selectiva para ser capaz de controlar si uno, dos, o tres residuos de unión a la albúmina (A) deben incorporarse en el compuesto de hormona de crecimiento. El espaciador hidrofílico (B) puede unirse a una cadena lateral de un aminoácido del compuesto de GH. Dicha cadena lateral de un aminoácido puede ser una cadena lateral de un aminoácido que se modificó químicamente, del compuesto de GH. Otra, de dicha cadena lateral de un aminoácido puede ser una cadena lateral de un aminoácido que se modificó enzimáticamente, del compuesto de GH.

60 Preferentemente, se usa una transglutaminasa para introducir un espaciador hidrofílico en el residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 o 141 en la sec. con núm. de ident. 1. Otra manera de introducir selectivamente un espaciador hidrofílico es en el residuo N-terminal del compuesto de la hormona de crecimiento, tal como hGH (sec. con núm. de ident. 1).

65

En el conjugado de la hormona de crecimiento de la fórmula (I) el fragmento A-W-B puede ser lineal o ramificado. En una modalidad, A-W-B no es un péptido lineal.

5 En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 en la sec. con núm. de ident. 1.

En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 en la sec. con núm. de ident. 1.

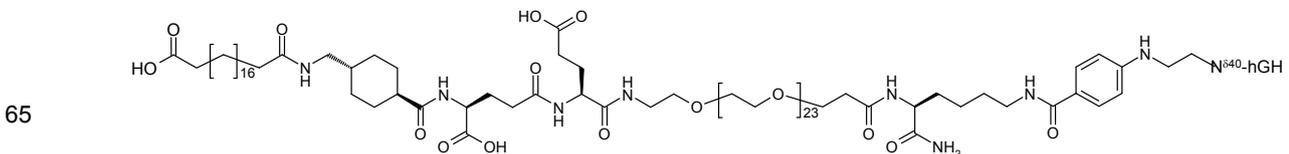
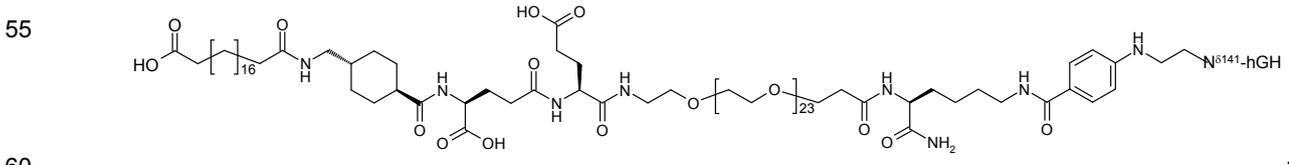
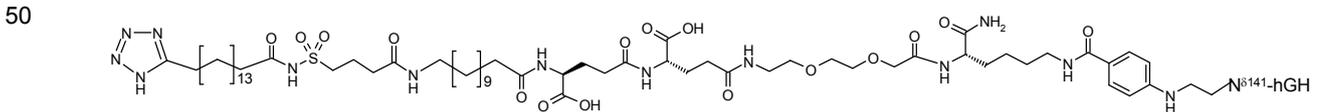
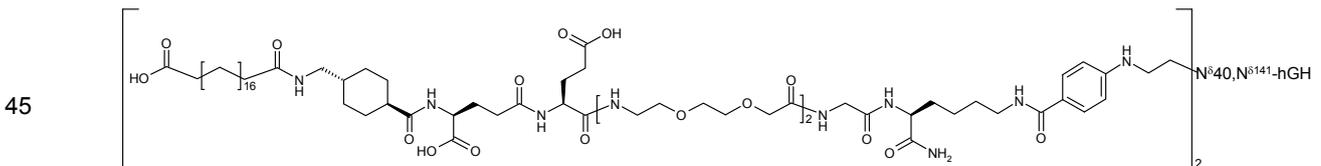
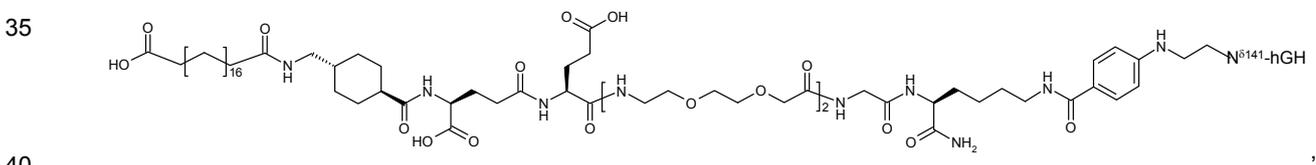
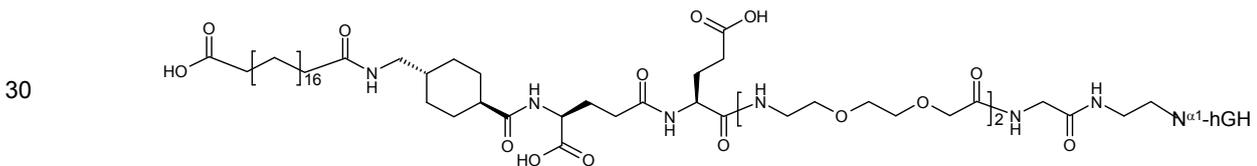
10 En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento, tal como hGH (sec. con núm. de ident. 1).

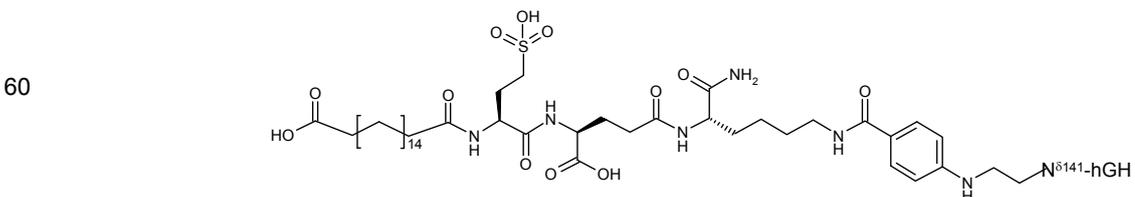
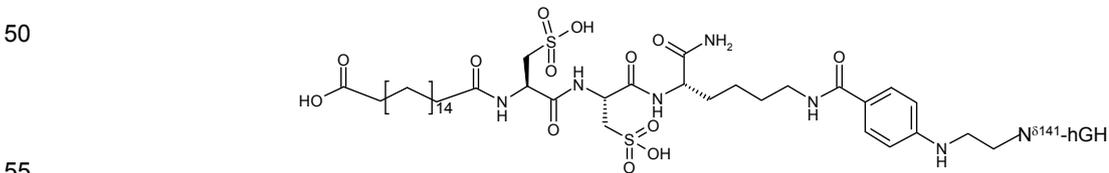
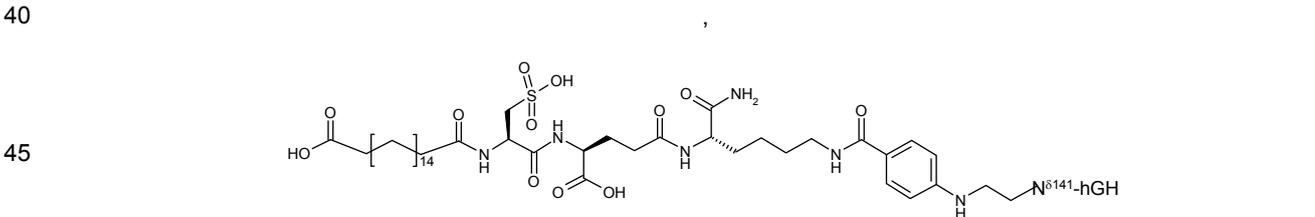
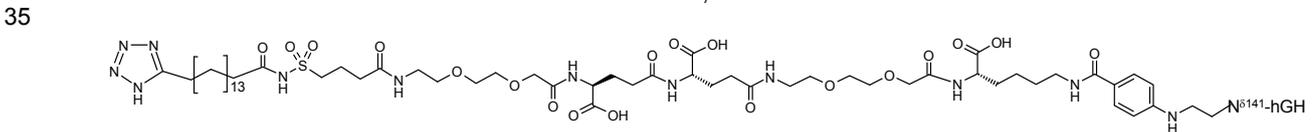
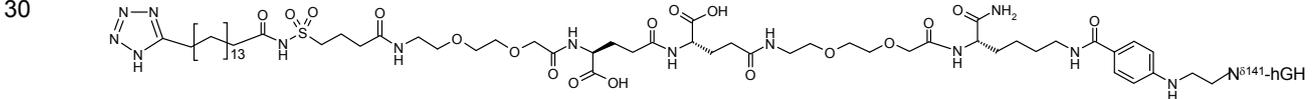
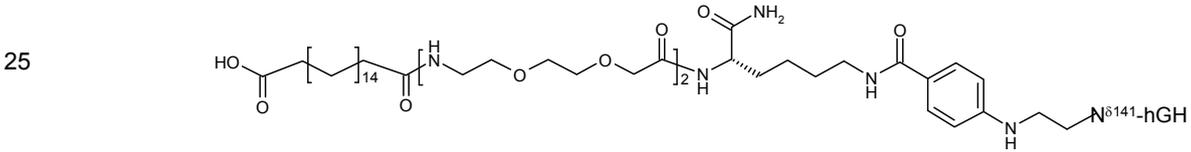
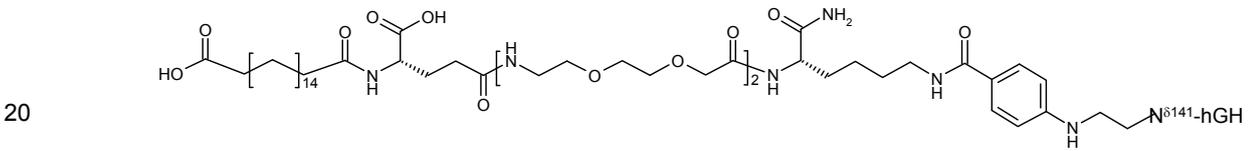
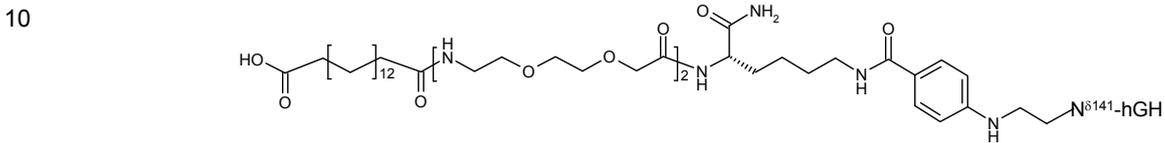
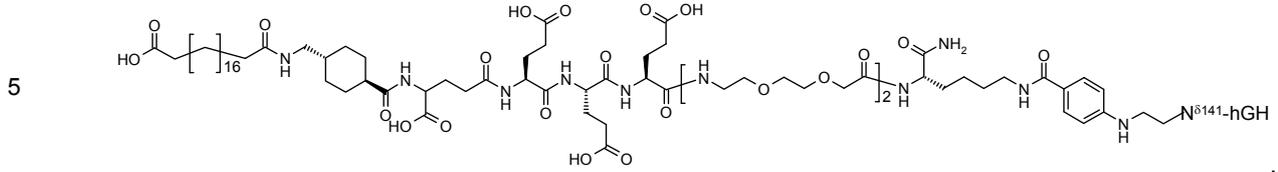
15 En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 y al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 en la sec. con núm. de ident. 1.

20 En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 y al residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento, tal como hGH (sec. con núm. de ident. 1).

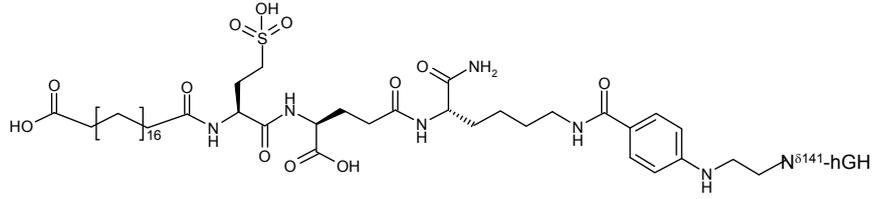
En otra modalidad el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 y al residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento, tal como hGH (sec. con núm. de ident. 1).

25 Los conjugados de la hormona de crecimiento de la presente invención se seleccionan de

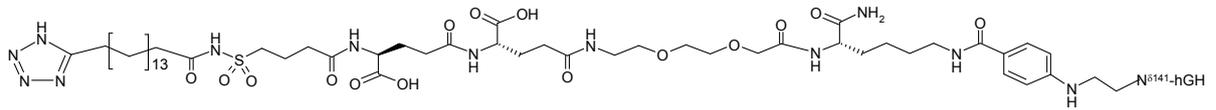




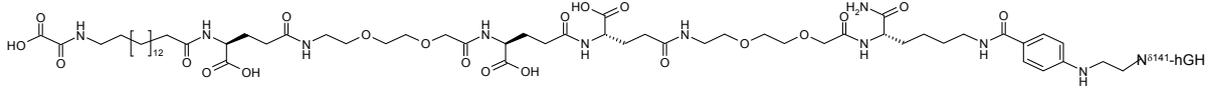
5



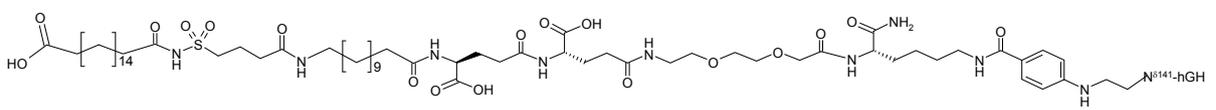
10



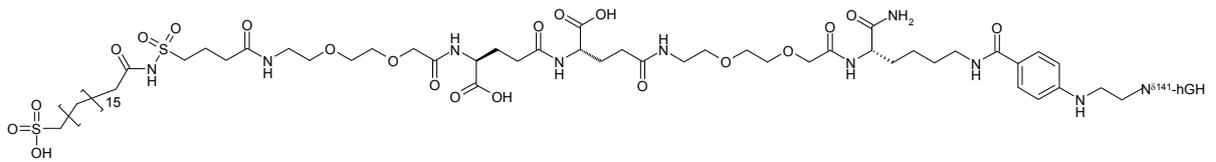
15



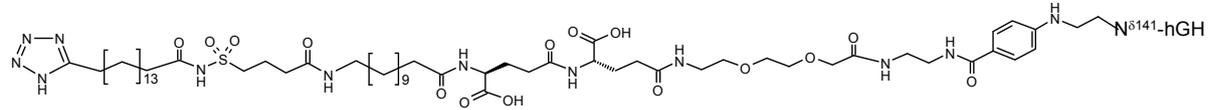
20



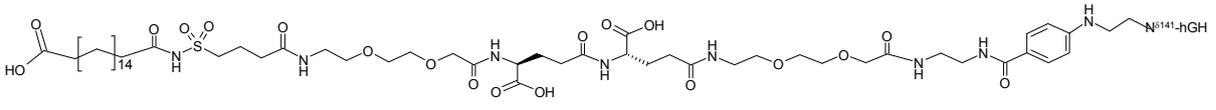
25



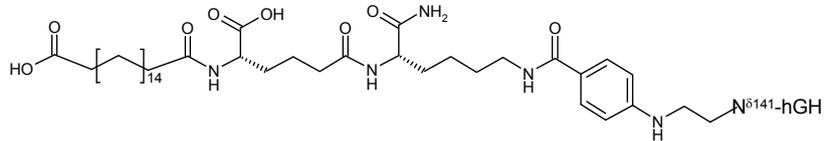
35



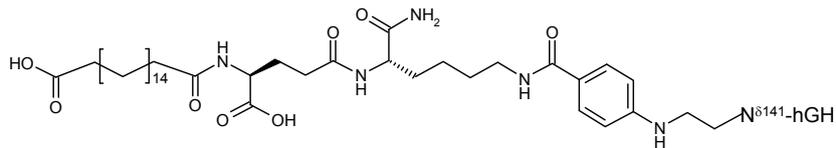
40



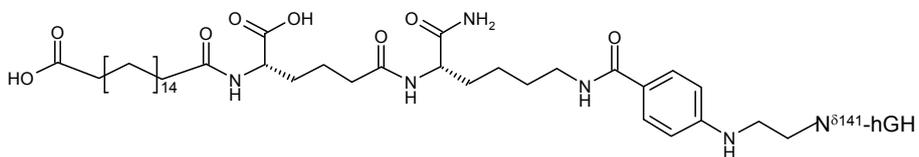
45



50



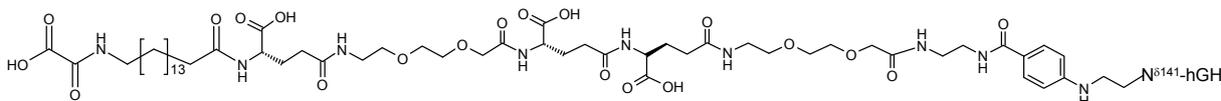
55



60

65

y



5

10 En otro aspecto la presente invención se refiere a un conjugado de una hormona de crecimiento que comprende un compuesto de hormona de crecimiento (GH) unido a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, o una sal, solvato o profármaco de este farmacéuticamente aceptables para usar en la terapia. Además, en el conjugado de una hormona de crecimiento de la presente invención GH, el residuo de unión a la albúmina, y el espaciador hidrofílico se seleccionan de cualquiera de las modalidades anteriores, en particular el conjugado de una hormona de crecimiento tiene la fórmula (I) o (II).

15 En otro aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una hormona de crecimiento que comprende un compuesto de hormona de crecimiento (GH) unido a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, o una sal, solvato o profármaco de este farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.

20 El término "identidad" como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más proteínas, según se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" se refiere además al grado de relación de las secuencias entre las proteínas, según se determina por la cantidad de coincidencias entre las cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el por ciento de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con los alineamientos de huecos (en caso de existir) dirigidos por un modelo matemático en particular o un programa de computadora (*es decir*, "algoritmos"). La identidad de proteínas relacionadas puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y otros, *SIAM J. Applied Math.*, 48, 1073, (1988).

35 Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas de computadora disponibles públicamente. Los métodos de programas de computadora preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux y otros, *Nucl. Acid. Res.*, 12, 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y otros, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y otros, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul y otros, *más arriba*). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

45 Por ejemplo, mediante el uso del algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), dos proteínas, para las cuales se va a determinar el por ciento de identidad de secuencia, se alinean para una coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (el "rango coincidente", según se determina por el algoritmo). Una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación en particular) y una penalización por extensión del hueco (que es usualmente {la fracción (1/10)} veces la penalización por apertura de hueco), así como se usa una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 junto con el algoritmo. El algoritmo también usa una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff y otros, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp.3 (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 10915-10919, (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

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

Algoritmo: Needleman y otros, *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453, (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10915-10919, (1992); Penalización por hueco: 12, Penalización por longitud del hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

60 El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros predeterminados para las comparaciones de proteínas (junto con la ausencia de penalización por huecos en los extremos) con el uso del algoritmo GAP.

65 Los compuestos de la presente invención tienen propiedades farmacológicas mejoradas en comparación con la correspondiente hormona de crecimiento no conjugada, que también se denomina como el compuesto original. Los

ejemplos de tales propiedades farmacológicas incluyen tiempo de vida media funcional *in vivo*, inmunogenicidad, filtración renal, protección de proteasas y unión a albúmina.

5 El término "tiempo de vida media funcional *in vivo*" se usa en su significado normal, es decir, el tiempo en que el 50 % de la actividad biológica de la GH o conjugado de GH todavía está presente en el cuerpo/órgano objetivo, o el tiempo en que la actividad de la GH o conjugado de GH es el 50 % de su valor inicial. Como una alternativa para determinar el tiempo de vida media funcional *in vivo*, puede determinarse el "tiempo de vida media *in vivo* en plasma", es decir, el tiempo en que el 50 % de la GH o conjugado de GH circula en el plasma o torrente sanguíneo antes de ser eliminado. La determinación del tiempo de vida media en plasma es frecuentemente más simple que determinar el tiempo de vida media funcional y la magnitud del tiempo de vida media en plasma es usualmente una buena indicación de la magnitud del tiempo de vida media funcional *in vivo*. Términos alternativos al tiempo de vida media en plasma incluyen tiempo de vida media en suero, tiempo de vida media en circulación, tiempo de vida media circulando, eliminación del suero, eliminación del plasma y tiempo de vida media de eliminación.

15 El término "aumento" como se usa junto con el tiempo de vida media funcional *in vivo* o el tiempo de vida media en plasma se usa para indicar que el tiempo de vida media relevante del conjugado de GH aumentó significativamente de manera estadística respecto del de la GH original, según se determina en condiciones comparables. Por ejemplo el tiempo de vida media relevante puede aumentar en al menos aproximadamente 25 %, tal como en al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, o 500 %. En una modalidad, los compuestos de la presente invención muestran un aumento en el tiempo de vida media de al menos aproximadamente 5 horas, preferentemente al menos aproximadamente 24 horas, con mayor preferencia al menos aproximadamente 72 horas, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 7 días, respecto del tiempo de vida media de la GH original.

25 La medición del tiempo de vida media en plasma *in vivo* puede llevarse a cabo de varias maneras como se describe en la literatura. Un aumento en el tiempo de vida media en plasma *in vivo* puede cuantificarse como una disminución en la eliminación (CL) o como un aumento en el tiempo medio de residencia (MRT). La GH conjugada de la presente invención para la cual la CL disminuye a menos del 70 %, tal como menos del 50 %, tal como menos del 20 %, tal como menos del 10 % de la CL de la GH original según se determina en un ensayo adecuado se dice que tiene un tiempo de vida media en plasma *in vivo* aumentado. La GH conjugada de la presente invención para la cual el MRT aumenta a más del 130 %, tal como más del 150 %, tal como más del 200 %, tal como más del 500 % del MRT de la GH original en un ensayo adecuado se dice que tiene un tiempo de vida media en plasma *in vivo* aumentado. La eliminación y el tiempo medio de residencia pueden evaluarse en estudios farmacocinéticos estándar mediante el uso de animales de prueba adecuados. Dentro de las capacidades de un experto en la técnica está elegir un animal de prueba adecuado para una proteína determinada. Las pruebas en seres humanos, por supuesto, representan la prueba final. Los animales de prueba adecuados incluyen ratas Sprague-Dawley machos, ratones y monos macacos todos normales. Típicamente los ratones y las ratas se inyectan en un único bolo subcutáneo, mientras que los monos pueden inyectarse en un único bolo subcutáneo o en una única dosis iv. La cantidad inyectada depende del animal de prueba. Posteriormente, se extraen muestras de sangre en un periodo de uno a cinco días según sea adecuado para la evaluación de CL y MRT. Las muestras de sangre se analizan convenientemente mediante técnicas de ELISA.

45 El término "inmunogenicidad" de un compuesto se refiere a la capacidad del compuesto, cuando se administra a un ser humano, para provocar una respuesta inmunitaria perjudicial, ya sea humoral, celular, o ambas. En cualquier subpoblación humana, pueden existir individuos que muestren sensibilidad a proteínas particulares administradas. La inmunogenicidad puede medirse mediante la cuantificación de la presencia de anticuerpos contra la hormona de crecimiento y/o células T sensibles a la hormona de crecimiento en un individuo sensible, mediante el uso de métodos convencionales conocidos en la técnica. En una modalidad, la GH conjugada de la presente invención muestra una disminución en la inmunogenicidad en un individuo sensible de al menos aproximadamente 10 %, preferentemente al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 40 % y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 50 %, respecto de la inmunogenicidad del individuo de la GH original.

55 Los términos "protección de proteasas" o "protegido de proteasas" como se usan en la presente indican que la GH conjugada de la presente invención es más resistente a la peptidasa o proteasas plasmáticas que la GH original. Se conoce que las enzimas proteasas y peptidasas presentes en el plasma están implicadas en la degradación de proteínas circulantes, como por ejemplo hormonas peptídicas circulantes, como la hormona de crecimiento.

60 La hormona de crecimiento puede ser susceptible a la degradación, por ejemplo, por la trombina, plasmina, subtilisina y serina proteinasa similar a la quimotripsina. Los ensayos para la determinación de la degradación de estas proteasas se describen en *J. Biotech.*, 65, 183, (1998). En una modalidad, la tasa de hidrólisis del conjugado de GH es menor que el 70 %, tal como menor que el 40 %, tal como menor que el 10 % de la de la GH original.

65 El componente proteico más abundante en la sangre circulante de especies de mamíferos es la albúmina sérica, que normalmente está presente a una concentración de aproximadamente 3 a 4,5 gramos por 100 mililitros de sangre total. La albúmina sérica es una proteína sanguínea de aproximadamente 70 000 daltons que tiene numerosas funciones importantes en el sistema circulatorio. Funciona como un transportador de una variedad de moléculas orgánicas que se encuentran en la sangre, como el transportador principal de diversos metabolitos tales como ácidos grasos y

bilirrubina a través de la sangre, y, debido a su abundancia, como un regulador osmótico de la sangre circulante. La albúmina sérica tiene un tiempo de vida media de más de una semana, y un enfoque para aumentar el tiempo de vida media en plasma de las proteínas ha sido conjugar a la proteína un grupo que se une a la albúmina sérica. La propiedad de unión a la albúmina puede determinarse como se describe en *J. Med. Chem.*, 43, 1986, (2000).

Los conjugados de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) ejercen una actividad de hormona de crecimiento y como tal pueden usarse en el tratamiento de enfermedades o estados que se beneficiarán de un aumento en la cantidad de hormona de crecimiento circulante. Se señala que cualquier referencia en la presente, a los métodos de tratamientos, se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para usar en un método de tratamiento.

En particular, la invención proporciona para usar en un método para el tratamiento de deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD); síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por HIV en niños que reciben tratamiento HAART (niños con HIV/HALS); niños que nacen pequeños para la edad gestacional (SGA); estatura pequeña en niños que nacen con muy bajo peso al nacer (VLBW) excepto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura pequeña idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en o de huesos largos, tal como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso, y dígitos; fracturas en o de huesos esponjosos, tal como el cráneo, base de la mano, y base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos en *por ejemplo* la mano, rodilla, u hombro; pacientes que tienen o padecen de osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se han fijado materiales de osteosíntesis, como clavos, tornillos y placas; pacientes sin unión o con una mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, *por ejemplo* de la tibia o del 1^{er} dedo del pie; pacientes después de implante de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla provocada por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada con estado de mal nutrición en APCD; reversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; HIV en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función hepática afectada; hombres con infecciones por HIV; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a HIV (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/fármacos o trauma neurológico; envejecimiento; ancianidad débil; osteoartritis; cartílago con daño traumático; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; o estatura pequeña debido al tratamiento con glucocorticoides en niños, el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad con eficacia terapéutica de un conjugado de una hormona de crecimiento de acuerdo con la fórmula (I) o (II).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para la aceleración de la cicatrización de tejido muscular, tejido nervioso o heridas; la aceleración o mejora del flujo sanguíneo al tejido lesionado; o la disminución de la tasa de infección en tejido dañado, el método comprende la administración, a un paciente que lo necesite, de una cantidad con eficacia terapéutica de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II).

En otra modalidad, la invención se refiere al uso de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) en la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que se benefician con un aumento en el nivel plasmático de la hormona de crecimiento, como las enfermedades mencionadas anteriormente.

Una dosis parenteral típica está en el intervalo de 10^{-9} mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por administración. Las dosis de administración típicas son de aproximadamente 0,0000001 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por administración. La dosis exacta dependerá *por ejemplo* de la indicación, el medicamento, la frecuencia y el modo de administración, el sexo, la edad y el estado general del sujeto que se va a tratar, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección que se va a tratar, el efecto deseado del tratamiento y otros factores evidentes para el experto en la técnica.

Las frecuencias de dosificación típicas son dos veces al día, una vez al día, dos veces diariamente, dos veces semanalmente, una vez a la semana o incluso en intervalos de dosificación más largos. Debido a los tiempos de vida media prolongados de las proteínas de fusión de la presente invención, un régimen de dosificación con intervalos de dosificación largos, como dos veces a la semana, una vez a la semana o incluso con intervalos de dosificación más largos es una modalidad particular de la invención.

Muchas enfermedades se tratan con el uso de más de un medicamento en el tratamiento, ya sea que se administren de manera concomitante o secuencial. Por lo tanto se describe el uso de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) en métodos terapéuticos para el tratamiento de una de las enfermedades mencionadas anteriormente en combinación con uno o más de otros compuestos terapéuticamente activos usados normalmente en el tratamiento de dichas enfermedades. Por analogía, se describe además el uso de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) en combinación con otros compuestos terapéuticamente activos usados

normalmente en el tratamiento de una de las enfermedades mencionadas anteriormente en la producción de un medicamento para dicha enfermedad.

Métodos generales de preparación

5

Conjugación enzimática:

En la preparación de un conjugado de una hormona de crecimiento de la presente invención, típicamente al menos uno de los enlaces covalentes establecidos en la preparación de un conjugado A-W-B-GH de fórmula (I) se prepara mediante el uso de una enzima como se ilustra en los ejemplos más adelante. Esta enzima por ejemplo puede seleccionarse del grupo que consiste en transglutaminasas, serina proteasas y cisteína proteasas. Típicamente, dicha enzima es una transglutaminasa. Dicha transglutaminasa por ejemplo puede seleccionarse del grupo que consiste en transglutaminasas microbianas, transglutaminasas tisulares y factor XIII y variantes de estas. En otra modalidad, dicha enzima es una cisteína proteasa. Una cisteína proteasa de este tipo, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en papaína, sortasa A y sortasa B. En otra modalidad, dicha enzima es una serina proteasa, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en carboxipeptidasa Y (CPY) (la solicitud PCT núm. WO2005/035553 contiene una descripción general de la modificación de proteína mediante el uso de CPY), tripsina y quimotripsina.

El conjugado de una hormona de crecimiento de la presente invención puede prepararse mediante muchos métodos diferentes, más adelante se muestran ejemplos.

La presente invención proporciona, además, métodos para preparar conjugados de A-W-B-GH de fórmula (I).

25 Transglutaminasa

Como se señaló anteriormente, al menos uno de los enlaces covalentes establecidos en la preparación de un conjugado de A-W-B-GH de la presente invención puede prepararse mediante el uso de una transglutaminasa. Las transglutaminasas pueden incluir transglutaminasas microbianas como la aislada a partir de las especies de *Streptomyces*; *S. mobaraense*, *S. cinnamomeum*, *S. griseocarneum* (documento US5156956), *S. lavendulae* (documento US5252469) y *Streptomyces ladakanum* (documento JP2003/199569). Otras transglutaminasas microbianas útiles se han aislado a partir de *Bacillus subtilis* (descrito en el documento US5731183) y a partir de diversos Mixomicetos. Otros ejemplos de transglutaminasas microbianas útiles son las descritas en el documento WO96/06931 (por ejemplo transglutaminasa de *Bacillus lydicus*) y el documento WO96/22366. Las transglutaminasas no microbianas útiles incluyen transglutaminasa hepática de cobayo, y transglutaminasas de diversas fuentes marinas como el pargo japonés *Pagrus major* (descrito en el documento EP0555649), y la ostra japonesa *Crassostrea gigas* (descrito en el documento US5736356). Los análogos funcionales y sus derivados también pueden ser útiles.

Típicamente, la TGasa utilizada en los métodos de la invención es una transglutaminasa microbiana. En una modalidad, la TGasa es de *S. mobaraense* o una variante de esta, por ejemplo como se describe en los documentos WO2007/020290 y WO2008/020075. En otra modalidad, la TGasa es de *S. ladakanum* o una variante de esta, por ejemplo como se describe en el documento WO2008/020075.

La conjugación de hGH a A-W-B de acuerdo con la presente invención puede lograrse mediante modificación mediada por TGasa lo que conduce a una alteración selectiva en posiciones específicas de lisina (Lys) o glutamina (Gln) en la secuencia del compuesto de GH en dependencia del sustrato utilizado. El uso de aminos como sustratos conducirá a la modificación de glutaminas mientras que el uso de amidas primarias conducirá a la modificación de lisinas. hGH (sec. con núm. de ident. 1) tiene 9 residuos de lisina en las posiciones 38, 41, 70, 115, 140, 145, 158, 168 y 172 y 13 residuos de glutamina en las posiciones 22, 29, 40, 46, 49, 68, 69, 84, 91, 122, 137, 141 y 181. No todas están disponibles fácilmente para la modificación ni son adecuadas para las modificaciones ya que esto conducirá a la disminución de la potencia de unión a la proteína de unión a la hormona de crecimiento, por tanto conduce a una actividad biológica reducida. La estructura de cristales de proteína por rayos X entre hGH y su proteína de unión (pdb: 3HHR) revela que al menos 4 lisinas (38, 41, 168 y 172) toman parte en la unión a la proteína de unión y potencialmente solo una de las glutaminas (Gln 46). Esto hace que las glutaminas sean más atractivas como objetivo para la introducción selectiva de un enlazador de unión a la albúmina. Estas consideraciones estructurales se sustentan adicionalmente por los hallazgos resumidos por N. Chêne y otros en *Reprod. Nutr. Develop.* 29, 1-25 (1989) donde se concluye que se ha encontrado que las modificaciones químicas que afectan las lisinas tienen un efecto negativo sobre la actividad biológica *in vivo* y sobre la capacidad de unión a los receptores hepáticos de GH.

60 Química I

En un aspecto la presente invención se refiere a una preparación de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (VI) en donde un compuesto de GH se trata con un aldehído o cetona derivado de un grupo modificador de las propiedades para producir una amina, imina o un hemiaminal.

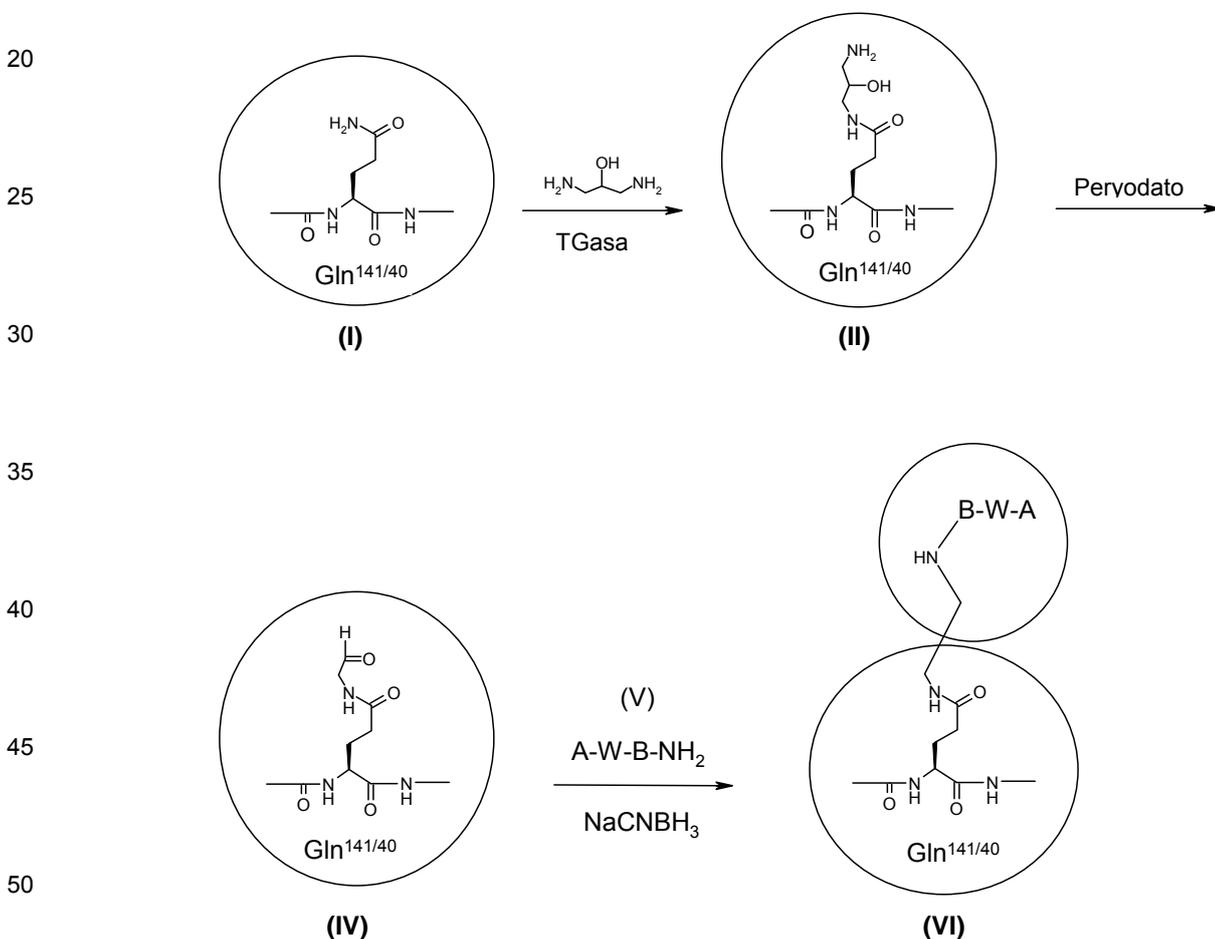
65

En otro aspecto la presente invención se refiere a una preparación de un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (VI) que comprende el tratamiento de un aldehído o cetona derivado del compuesto de GH con una anilina o heteroarilamina derivada de un grupo modificador de las propiedades para producir una amina, imina o un hemiaminal.

5 En una modalidad, un aldehído derivado del compuesto de GH (IV) se trata con una anilina o heteroarilamina derivada de un grupo modificador de las propiedades (V).

10 El término "aldehído (o cetona) derivado de un compuesto de GH" o "un aldehído o cetona derivado del compuesto de GH" se entiende que indica un compuesto de GH al que se ha unido covalentemente un grupo funcional de aldehído o cetona, o un compuesto de GH sobre el cual se ha generado un grupo funcional de aldehído o cetona. La preparación de aldehídos derivados de un compuesto de GH, tal como el compuesto (IV) ilustrado más adelante se conoce bien por los expertos en la técnica, y cualquiera de estos procedimientos conocidos puede usarse para preparar el aldehído derivado de un compuesto de GH (IV) necesario para la realización de la invención descrita en la presente.

15 En una modalidad, el conjugado A-W-B-hGH (VI) se prepara como se ilustra a continuación:

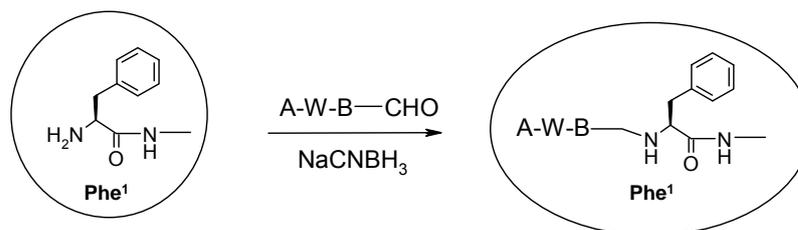


55 La reacción enzimática con GH mediada por TGasa (I) da como resultado la modificación de la Gln en la posición 141 y/o 40 para producir GH (II). La conjugación de GH oxidada con peryodato (II) con A-W-B-NH₂ (V) se produce por medio de alquilación reductiva. La alquilación reductiva se ejemplifica en la presente y se conoce bien en la técnica y da como resultado compuestos de GH (VI) modificados en la posición Gln(141) y/o 40.

60 Química II

En una modalidad, el conjugado A-W-B-hGH se prepara como se ilustra a continuación:

65



El proceso de derivación como se mostró anteriormente proporciona un enlazador de unión a la albúmina unido a un compuesto de hGH en la posición Phe(1).

15 Generalmente se considera que una relación estrecha con el péptido natural es una ventaja con intervenciones terapéuticas que comprenden la administración de variantes o análogos de este péptido natural ya que minimiza el riesgo, *por ejemplo*, de cualquier generación no deseada de anticuerpos.

20 Se conocen muchos compuestos nucleofílicos que pueden incorporarse en los péptidos de acuerdo con los métodos de la presente invención, y los α -aminoácidos son uno de esos tipos de compuestos nucleofílicos. Sin embargo, para el propósito de la presente invención, se prefiere seleccionar el compuesto nucleofílico de manera que el compuesto transacilado que se forma no sea un sustrato para la enzima aplicada. En otras palabras, se prefiere aplicar un compuesto nucleofílico que bloquee eficazmente cualquier otra reacción de la enzima. Un ejemplo de tales compuestos son las amidas de α -aminoácidos ya que los péptidos carboxi amidados no son sustratos de las carboxipeptidasas.

25 Se reconoce que el hecho de que un compuesto sea un sustrato para una enzima determinada o no, en principio, depende de las condiciones, *por ejemplo* el marco de tiempo, en que tiene lugar la reacción. Dado un tiempo suficiente, muchos compuestos son, de hecho, sustratos para una enzima aunque en condiciones normales no se consideren como tal. Cuando se plantea anteriormente que el compuesto transacilado en sí mismo no debe ser un sustrato de la enzima se entiende que esto indica que el compuesto transacilado en sí mismo no es un sustrato para la enzima en el grado en que se alteren las siguientes reacciones en el método de la presente invención. Si el compuesto transacilado es, de hecho, un sustrato para la enzima, la enzima puede eliminarse o inactivarse, *por ejemplo* mediante inhibidores enzimáticos, después de la reacción de transacilación.

35 Composiciones farmacéuticas

Otro propósito es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una hormona de crecimiento de la presente invención, tal como un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II), que está presente en una concentración de 10^{-15} mg/ml a 200 mg/ml, tal como *por ejemplo* 10^{-10} mg/ml a 5 mg/ml y en donde dicha composición tiene un pH de 2,0 a 10,0. La composición puede comprender, además, excipientes farmacéuticos, tales como un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y tensoactivos. En una modalidad de la invención la composición farmacéutica es una composición acuosa, *es decir* una composición que comprende agua. Dicha composición es típicamente una solución o una suspensión. En una modalidad adicional de la invención, la composición farmacéutica es una solución acuosa. El término "composición acuosa" se define como una composición que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

50 En otra modalidad, la composición farmacéutica es una composición liofilizada, a la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes del uso.

En otra modalidad, la composición farmacéutica es una composición seca (*por ejemplo*, liofilizada o secada por atomización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

55 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa de un conjugado de una hormona de crecimiento, tal como un conjugado de una hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II), y un tampón, en donde dicho conjugado de GH está presente en una concentración de 0,1-100 mg/ml o superior, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

60 En otra modalidad de la invención el pH de la composición se selecciona de la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 y 10,0.

65 En una modalidad adicional de la invención el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno

fosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroxi metil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

5 En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un conservante aceptable farmacéuticamente. En una modalidad adicional de la invención, el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidaurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. En una modalidad adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^{ma} edición, 2000.

20 En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un agente isotónico. En otra modalidad de la invención el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (*por ejemplo* cloruro de sodio), un azúcar o azúcar alcohólico, un aminoácido (*por ejemplo* L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina),

25 un alditol (*por ejemplo* glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (*por ejemplo* PEG 400), o sus mezclas. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, que incluyen, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de Na. En una modalidad el aditivo de azúcar es sacarosa. El azúcar alcohólico se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una modalidad, el aditivo de azúcar alcohólico es manitol. Los azúcares o azúcares alcohólicos mencionados anteriormente pueden usarse individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad usada, siempre que el azúcar o el azúcar alcohólico sean solubles en la preparación líquida y no afecten negativamente los efectos estabilizantes alcanzados con el uso de los métodos de la invención. En una modalidad, la concentración del azúcar o del azúcar alcohólico está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^{ma} edición, 2000.

45 En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un agente quelante. En una modalidad adicional de la invención, el agente quelante se selecciona de sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y sus mezclas. En una modalidad adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una modalidad adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una modalidad alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^{ma} edición, 2000.

55 En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^{ma} edición, 2000.

60 Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes con actividad terapéutica incluyen una proteína que posiblemente muestra formación de agregados durante el almacenamiento en composiciones farmacéuticas líquidas. Por el término "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas proteicas que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por el término "durante el almacenamiento" se entiende una composición farmacéutica líquida o composición que una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, después de la preparación, se empaqueta para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por el término "forma seca" se entiende la composición farmacéutica líquida o la composición que se seca ya sea por secado por congelación (*es decir*,

liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli, *J. Parenteral Sci. Technol.* 38, 48-59, (1984)), secado por aspersión (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5^a ed; Longman Scientific and Technical, Essez, U.K.), pp. 491-676; Broadhead y otros (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18, 1169-1206, (1992); y Mumenthaler y otros, *Pharm. Res.* 11, 12-20 (1994)), o secado al aire (Carpenter y Crowe, *Cryobiology* 25, 459-470, (1988); y Roser, *Biopharm.* 4, 47-53, (1991)). La formación de agregados por una proteína durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar negativamente la actividad biológica de esa proteína, lo que resulta en la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene la proteína se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, además, una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por la proteína durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden presentarse en sus formas de base libre, todos pueden presentarse en sus formas de sal, o algunos pueden presentarse en sus formas de base libre, mientras otros se presentan en sus formas de sal. En una modalidad, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (*es decir*, isómero L o D, o mezclas de estos) de un aminoácido en particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas) o combinaciones de estos estereoisómeros o glicina o una base orgánica como imidazol, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido o base orgánica en particular estén presentes ya sea en su forma de base libre o su forma de sal. En una modalidad, se usa el estereoisómero L de un aminoácido. En una modalidad, se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención pueden formularse, además, con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que produce el efecto deseado de disminución de la formación de agregados por la proteína durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En una modalidad adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración, que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

En una modalidad adicional de la invención, puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a metionina sulfóxido cuando la proteína que actúa como agente terapéutico es una proteína que comprende al menos un residuo de metionina susceptible a tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina en el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina resulta en una mayor retención de la proteína en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (isómero L o D) o cualquiera de sus combinaciones. La cantidad que debe añadirse debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de metionina sulfóxido sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % de metionina sulfóxido. Generalmente, esto puede alcanzarse mediante la adición de metionina de manera que la relación entre la metionina añadida y los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un estabilizante seleccionado del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una modalidad adicional de la invención el estabilizante se selecciona de polietilenglicol (*por ejemplo*, PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o sus derivados (*por ejemplo*, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (*por ejemplo*, cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, agentes estabilizantes adicionales, que mejoran adicionalmente la estabilidad de una proteína activa terapéuticamente en estas. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen metionina y EDTA, que protegen la proteína contra la oxidación de la metionina, y un tensoactivo no iónico, que protege la proteína contra la agregación asociada a la congelación-descongelación o al cizallamiento mecánico.

En una modalidad adicional de la invención, la composición comprende, además, un tensoactivo. En otra modalidad de la invención el tensoactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados,

ésteres de sorbitán y ácido graso, polímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (*por ejemplo*, poloxámeros como Pluronic[®] F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de polioxietileno sorbitán y ácido graso, derivados

de polioxietileno y polietileno como derivados alquilados y alcoxilados (polisorbatos, *por ejemplo* Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus derivados de polioxietileno, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter)- derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, *por ejemplo* lauroil y miristoil derivados de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de la cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP cargados positivamente, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), glicero glicolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina del huevo de gallina, derivados del ácido fusídico - (*por ejemplo* taurodihidrofusidato de sodio, etcétera), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C₆-C₁₂ (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados de lisina, arginina o histidina, N α -acilados, o derivados de lisina o arginina acilados en la cadena lateral, derivados N α -acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N α -acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, registro CAS núm. [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS núm. [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS núm. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de estos, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensoactivos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos) aniónicos, tensoactivos zwitteriónicos (*por ejemplo* N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensoactivos catiónicos (bases cuaternarias de amonio) (*por ejemplo* bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensoactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil β -D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, de Tetronic), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensoactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina, o sus mezclas. Cada uno de estos tensoactivos específicos constituye una modalidad alternativa de la invención.

El uso de un tensoactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^{ma} edición, 2000.

Es posible que puedan presentarse otros ingredientes en la composición farmacéutica de la presente invención. Estos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (*por ejemplo*, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (*por ejemplo*, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Estos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar negativamente la estabilidad general de la composición farmacéutica de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un conjugado de una hormona de crecimiento de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y las mucosas, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

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

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

Las composiciones de la invención pueden adicionalmente, combinarse, o unirse, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrofóbicas y electrostáticas, con un portador farmacéutico, sistema de administración de fármacos y sistema avanzado de administración de fármacos para mejorar adicionalmente la estabilidad del conjugado de la hormona de crecimiento, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar la conformidad del paciente o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración de fármacos y sistemas avanzados de administración de fármacos incluyen polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(vinil alcohol), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico

y sus copolímeros en bloque, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas copoliméricos en bloque bien conocidos por los expertos en la técnica, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y sus dispersiones, fase L2 y sus dispersiones, bien conocidas por los expertos en la técnica del comportamiento de fase en sistemas de lípidos y agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y sus derivados, y dendrímeros.

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

Las composiciones de la presente invención son útiles específicamente en la composición de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, las composiciones son útiles en la composición de sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida parenteral (ambos sistemas conducen a una reducción en muchas veces de la cantidad de administraciones), bien conocidos por los expertos en la técnica. Aún con mayor preferencia, son sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas y composiciones de liberación controlada útiles son los hidrogeles, los geles oleaginosos, los cristales líquidos, las micelas poliméricas, las microesferas, las nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a presión alta, encapsulación, secado por atomización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general al manual de *Pharmaceutical Controlled Release* (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y *Drug and the Pharmaceutical Sciences* vol. 99: *Protein Composition and Delivery* (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

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

El término "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas.

El término "estabilidad física" de la composición de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados inactivos biológicamente y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estrés termomecánico y/o interacción con las interfaces y las superficies que son desestabilizantes, tales como las superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las composiciones acuosas de proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer la composición vertida en contenedores adecuados (*por ejemplo*, cartuchos o frascos) a estrés mecánico/físico (*por ejemplo*, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. La inspección visual de las composiciones se realiza en una luz nítida enfocada con un fondo oscuro. La turbidez de la composición se caracteriza mediante una calificación visual por asignación de una puntuación del grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una composición que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0, y una composición que muestra visualmente una turbidez a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una composición se clasifica como inestable físicamente con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra una turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la composición puede evaluarse mediante mediciones simples de la turbidez bien conocidas por los expertos. La estabilidad física de las composiciones acuosas de proteínas puede evaluarse, además, mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferencialmente a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de estructura proteica es la tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y tal vez también de otras configuraciones de proteínas, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma de proteína fibrilar. La tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

Pueden usarse otras moléculas pequeñas como sondas de los cambios en la estructura de la proteína de estados naturales a no naturales. Por ejemplo, las sondas de "parches hidrófobos" que se unen preferencialmente a parches

hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado natural, pero quedan expuestos a medida que una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colorantes hidrófobos, aromáticos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos con el metal cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina.

El término "estabilidad química" de la composición de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible menor potencia biológica y/o un aumento potencial de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína natural. Pueden formarse diversos productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del entorno al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química muy probablemente puede no evitarse completamente y a menudo se observan cantidades aumentadas de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la composición de proteínas como es bien conocido por el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que se hidroliza el grupo amida de la cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & M.C., Plenum Press, Nueva York, 1992*). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la composición de proteína puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (a menudo la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación en dependencia del tamaño de la molécula y/o la carga mediante el uso de diversas técnicas de cromatografía (*por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC*).

Por lo tanto, como se señaló anteriormente, una "composición estabilizada" se refiere a una composición con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas. En general, una composición debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra modalidad de la invención, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una modalidad adicional de la invención, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Aún en otra modalidad de la invención, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

Debe interpretarse que los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares como se usan en el contexto de la descripción de la invención cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente.

La mención de intervalos de valores en la presente descripción solo pretende servir como un método de escritura rápido para referirse individualmente a cada valor separado comprendido dentro del intervalo, a menos que se indique de otra manera en la presente descripción, y cada valor separado se incorpora en la descripción como si se mencionara individualmente en la presente descripción. A menos que se establezca de otra manera, todos los valores exactos proporcionados en la presente descripción son representativos de los valores aproximados correspondientes (*por ejemplo, puede considerarse que todos los valores exactos ilustrativos proporcionados con respecto a un factor o medición particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente"; donde sea apropiado*).

Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o de un lenguaje ilustrativo (*por ejemplo*, "tal como") proporcionados en la presente descripción, pretende meramente iluminar mejor la invención. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica que cualquier elemento es esencial para la práctica de la invención a menos que se establezca explícitamente.

5 La cita e incorporación de documentos de patentes en la presente descripción se realiza solo por conveniencia y no refleja ningún punto de vista sobre la validez, patentabilidad y/o exigibilidad de tales documentos de patentes.

10 La descripción incluye además las modalidades mencionadas aquí más adelante que no deben interpretarse como una descripción de la invención reivindicada.

15 1. Un conjugado de una hormona de crecimiento que comprende un compuesto de hormona de crecimiento (GH) unido a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de este.

2. El conjugado de la modalidad 1 en donde el espaciador hidrofílico tiene un $m\text{LogP} < 0$ o un $c\text{LogP} < 0,5$.

20 3. El conjugado de la modalidad 1 o 2 en donde el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a un residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico.

4. El conjugado de la modalidad 1 o 2 en donde el compuesto de hormona de crecimiento (GH) se une a dos o tres residuos de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico.

25 5. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-4 en donde el espaciador hidrofílico tiene la fórmula

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$
en donde

30 X_1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 es $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 es $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$,

35 X_4 es $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$,

$l1, l2, l3, l4, l5$ e $l6$ se seleccionan independientemente de 0-16,

40 $m1, m3, m4, m6$ y $m7$ se seleccionan independientemente de 0-10,

$m2$ y $m5$ se seleccionan independientemente de 0-25,

$n1, n2, n3$ y $n4$ se seleccionan independientemente de 0-16,

45 F es arilo, hetarilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia, en donde los grupos arilo y hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, $-CN$, $-OH$, $-C(O)OH$,

$-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ o C_{1-6} -alquilo,

50 R^1, R^2, R^3, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, $-C(O)OH$,

$-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -alquilo, arilo o hetarilo; en donde los grupos alquilo, arilo y hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, $-C(O)OH$,

55 $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$, u $-OH$,

$D1, D2, E1$ y $E2$ se seleccionan independientemente de $-O-$, $-NR^6-$, $-N(COR^7)-$ o un enlace de valencia; en donde R^6 y R^7 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo,

60 W_1 a W_6 se seleccionan independientemente de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s1$ es 0 o 1,

o una sal, amida, o éster farmacéuticamente aceptables de este.

65 6. Un conjugado de una hormona de crecimiento de la fórmula (I):

A-W-B-GH(I)

en donde

5 GH representa un compuesto de hormona de crecimiento,

B representa un espaciador hidrofílico,

10 W es un grupo químico que une A y B, y

A representa un residuo de unión a la albúmina; y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de este.

15 7. El conjugado de la modalidad 6 en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (sec. con núm. de ident.:1).

20 8. El conjugado de la modalidad 6 o 7, en donde GH es hGH (sec. con núm. de ident.:1).

9. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-8 en donde B tiene la fórmula

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

25 en donde

X_1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

30 X_2 es $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 es $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$,

X_4 es $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$,

35 $l1, l2, l3, l4, l5$ e $l6$ se seleccionan independientemente de 0-16,

$m1, m3, m4, m6$ y $m7$ se seleccionan independientemente de 0-10,

40 $m2$ y $m5$ se seleccionan independientemente de 0-25,

$n1, n2, n3$ y $n4$ se seleccionan independientemente de 0-16,

45 F es arilo, hetarilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia, en donde los grupos arilo y hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, -CN, -OH, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo,

50 R^1, R^2, R^3, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-alquilo, arilo o hetarilo; en donde los grupos alquilo, arilo y hetarilo opcionalmente se sustituyen con halógeno, -C(O)OH,

-C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN u -OH,

55 $D1, D2, E1$ y $E2$ se seleccionan independientemente de -O-, -NR⁶-, -N(COR⁷)- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

60 W_1 a W_6 se seleccionan independientemente de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, o un enlace de valencia; en donde $s2$ es 0 o 1.

10. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-9, en donde W tiene la fórmula

65 $-W_7-Y-$,

ES 2 703 388 T3

en donde

Y es $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{C}_{3-10}$ -cicloalquil- W_8 - o un enlace de valencia,

5 17 es 0-6,

W_7 se selecciona de $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$,

10 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2)_{s3}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, o un enlace de valencia; en donde $s3$ es 0 o 1,

W_8 se selecciona de $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$,

15 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$,

$-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$,

$-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{s4}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, o un enlace de valencia; en donde $s4$ es 0 o 1.

20 11. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-10, en donde 11 , 12 , 13 , 14 , 15 e 16 independientemente son 0-6.

12. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-11, en donde $m1$, $m3$, $m4$, $m6$ y $m7$ independientemente son 0-6.

25 13. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-12, en donde $m2$ y $m5$ independientemente son 0-10.

14. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-13, en donde $n1$, $n2$, $n3$ y $n4$ independientemente son 0-10, tal como 0-6.

30 15. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-14, en donde $D1$ y $D2$ se seleccionan independientemente de $-\text{O}-$ o $-\text{NR}^6-$ o un enlace de valencia.

16. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-15, en donde $D1$ es NR^6- .

35 17. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-16, en donde $D2$ es NR^6- .

18. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-17, en donde $D1$ y $D2$ son ambos $-\text{O}-$.

19. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-18, en donde $D1$ y $D2$ son ambos $-\text{NR}^6-$.

40 20. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-19, en donde $E1$ y $E2$ se seleccionan independientemente de $-\text{O}-$ o $-\text{NR}^6-$ o un enlace de valencia.

21. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-20, en donde $E1$ es NR^6- .

45 22. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-21, en donde $E2$ es NR^6- .

23. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-22, en donde $E1$ y $E2$ son ambos $-\text{O}-$.

50 24. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-23, en donde $E1$ y $E2$ son ambos $-\text{NR}^6-$.

25. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-24, en donde W_1 a W_8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$,

55 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ o un enlace de valencia.

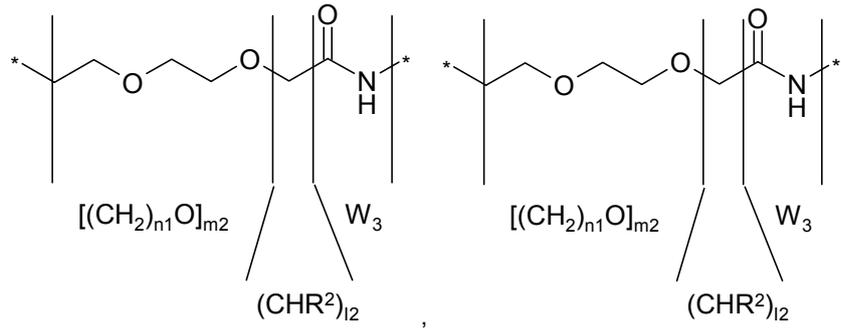
26. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-25, en donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ o C_{1-6} -alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$.

60 27. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-26, en donde $-[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E}1]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}$ - y

$-[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E}2]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}$ -, en donde $\text{E}1$ y $\text{E}2$ son O , se seleccionan de

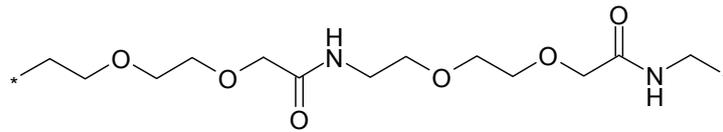
65

5

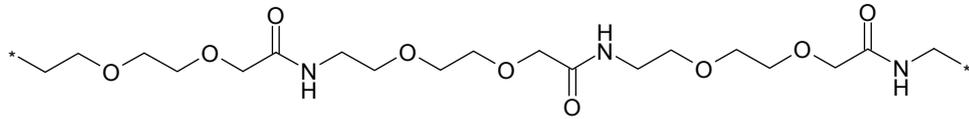


10

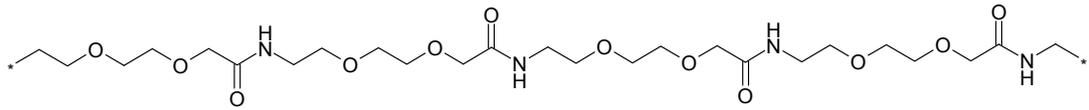
15



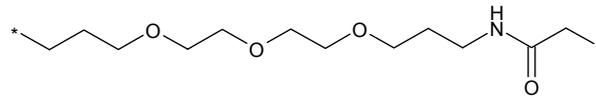
20



25



30

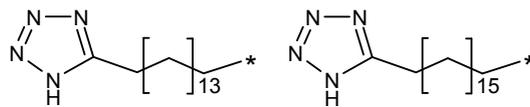


35

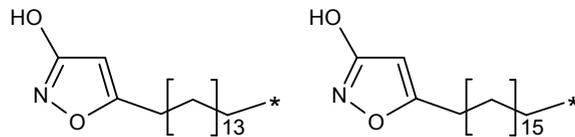
en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

28. El conjugado de cualquiera de las modalidades 6-27, en donde A se selecciona de

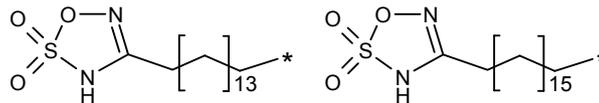
40



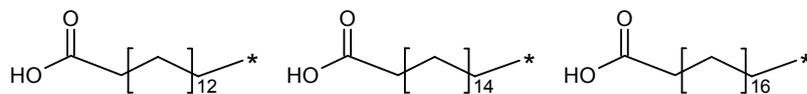
45



50



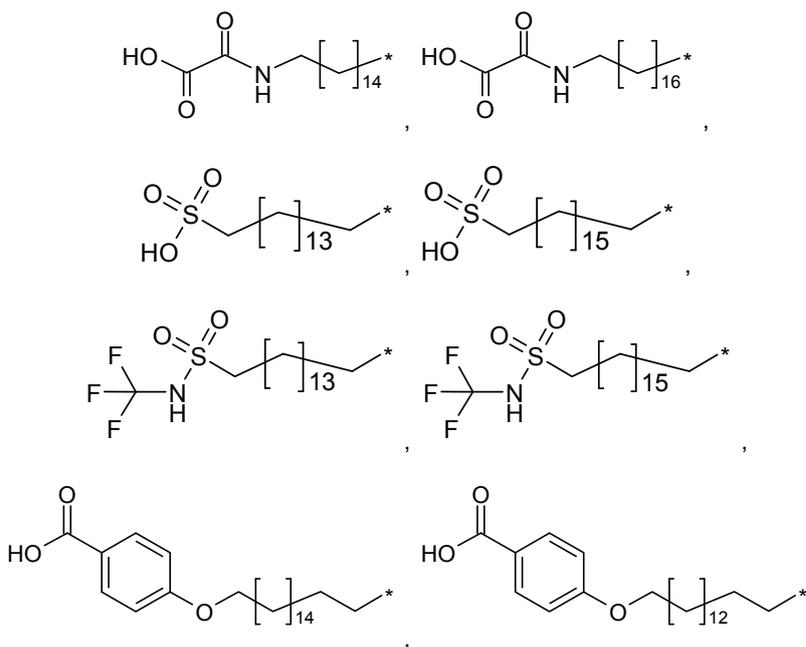
55



60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



en donde * denota la unión a B a W.

29. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-28, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 en la sec. con núm. de ident. 1.

30. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-29, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 en la sec. con núm. de ident. 1.

31. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-30, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento, tal como hGH (sec. con núm. de ident. 1).

32. Un conjugado de una hormona de crecimiento de la fórmula (II):



en donde

GH representa un compuesto de hormona de crecimiento,
W es un grupo químico que une A y B,

W' es un grupo químico que une A' y B',

A y A' representan independientemente un residuo de unión a la albúmina,

B y B' independientemente son espaciadores hidrofílicos, y

sales, solvatos y profármacos farmacéuticamente aceptables de este.

33. El conjugado de la modalidad 32, en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (sec. con núm. de ident.:1).

34. El conjugado de la modalidad 33, en donde GH es hGH (sec. con núm. de ident.:1).

35. El conjugado de cualquiera de las modalidades 32-34, en donde W' se selecciona de W, A' se selecciona de A y B' se selecciona de B.

36. El conjugado de cualquiera de las modalidades 32-35, en donde W y W', A y A', y B y B' se seleccionan independientemente de sus definiciones respectivas de cualquiera de las modalidades 6-31.

5 37. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el peso molar de dicho espaciador hidrofílico está en el intervalo de 80 D a 1500 D o en el intervalo de 500 D a 1100 D.

38. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina es un residuo lipofílico.

10 39. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina se une no covalentemente a la albúmina.

40. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico.

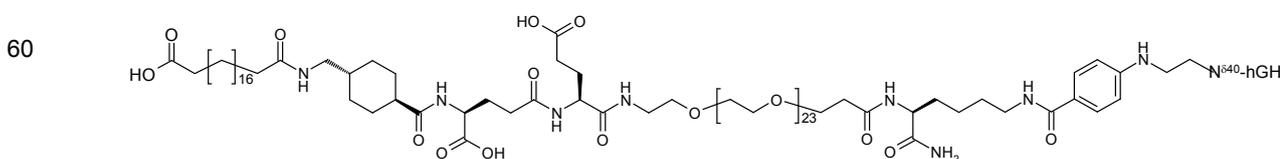
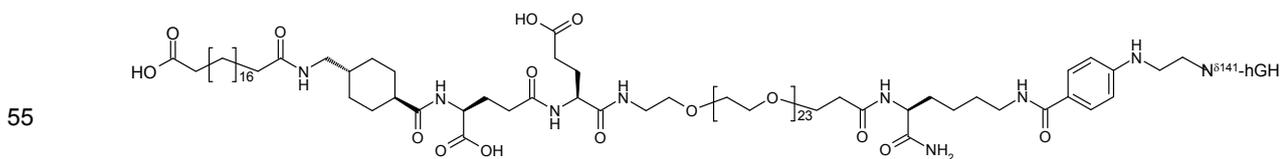
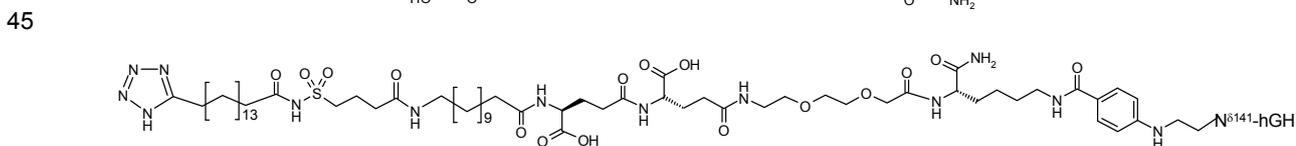
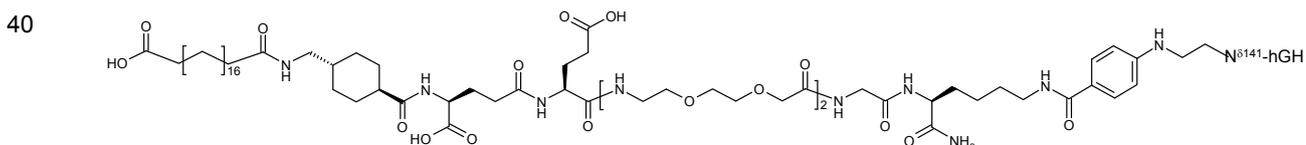
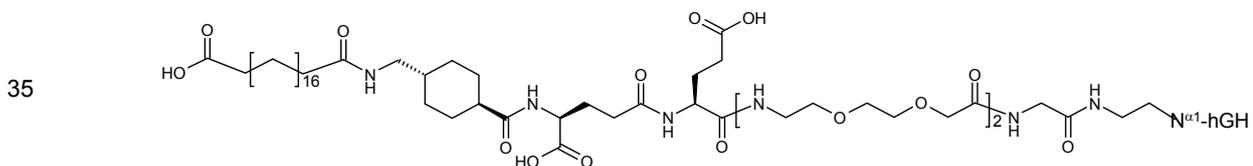
15 41. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina tiene una afinidad de unión a la albúmina sérica humana que está por debajo de aproximadamente 10 μM o por debajo de aproximadamente 1 μM .

20 42. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina se selecciona de un grupo alquilo de cadena lineal, un grupo alquilo ramificado, un grupo que tiene un grupo de ácido ω -carboxílico o un isómero de ácido ω -carboxílico.

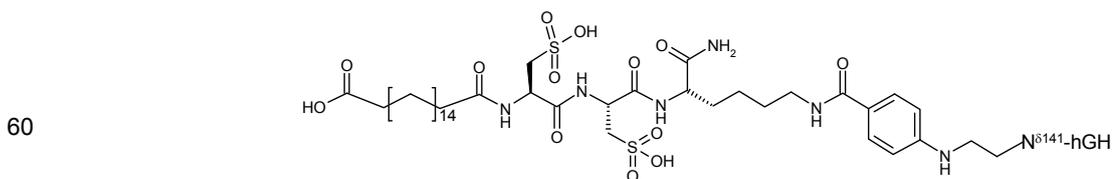
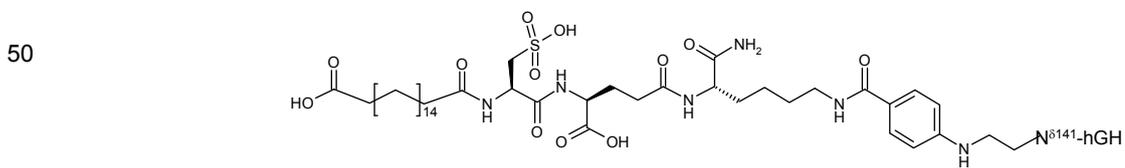
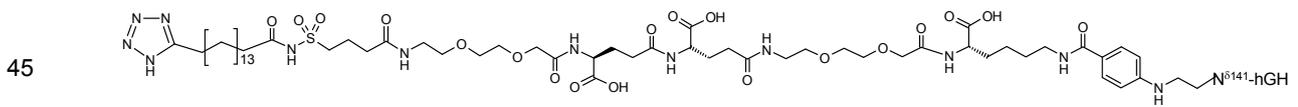
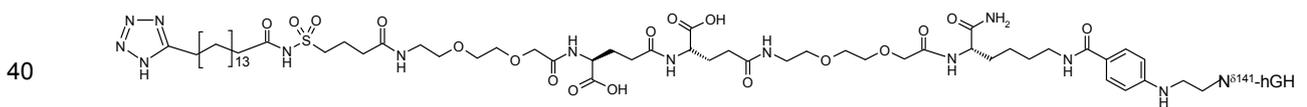
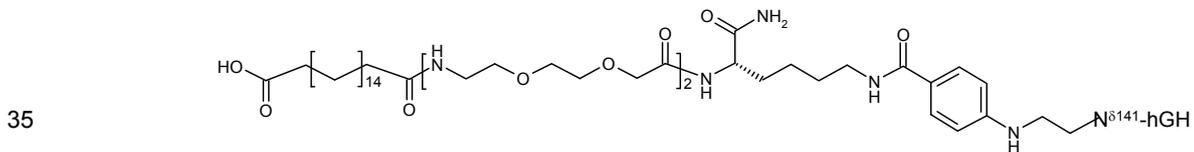
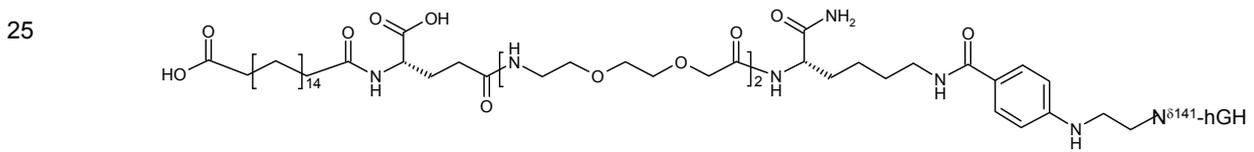
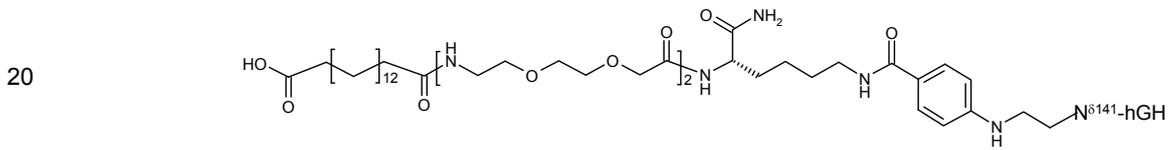
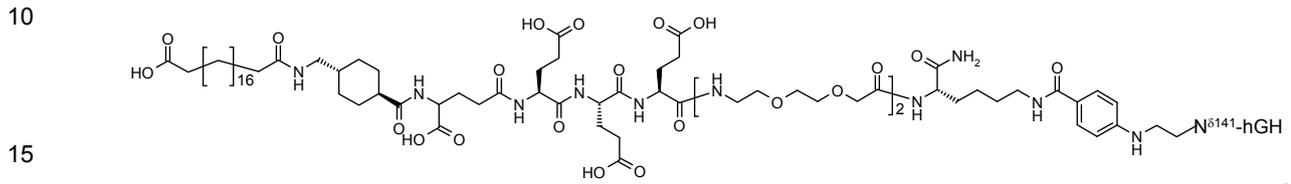
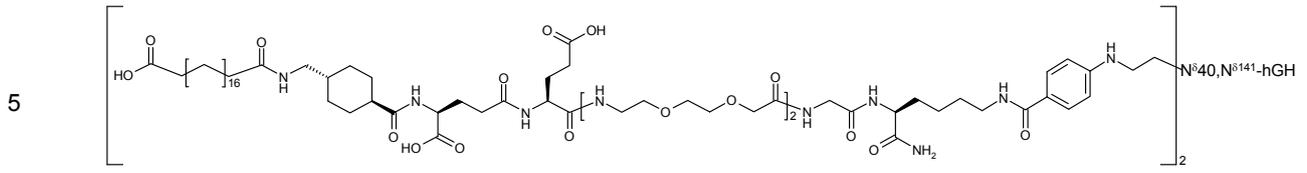
25 43. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 8 a 20 átomos de carbono.

44. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho residuo de unión a la albúmina es un péptido, tal como un péptido que comprende menos de 40 residuos de aminoácidos.

30 45. El conjugado de cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho compuesto se selecciona de

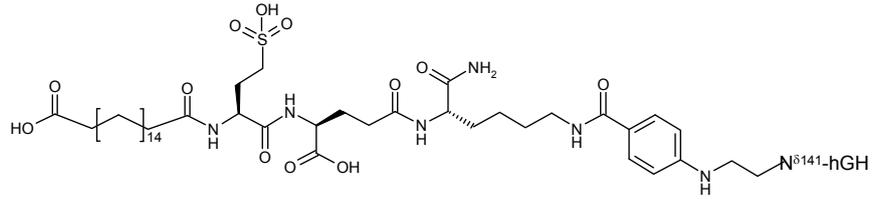


65

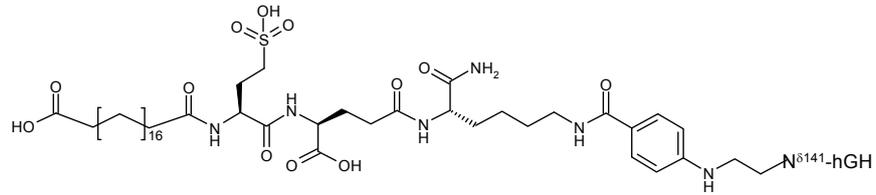


65

5

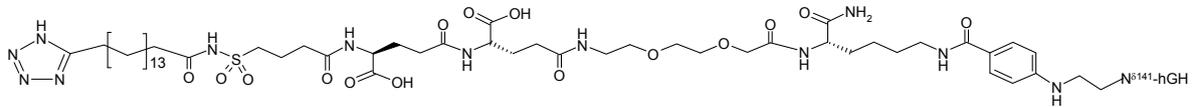


10

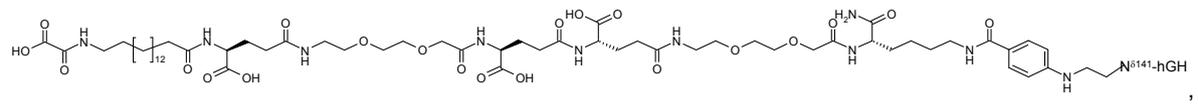


15

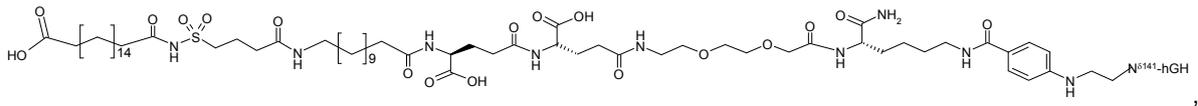
20



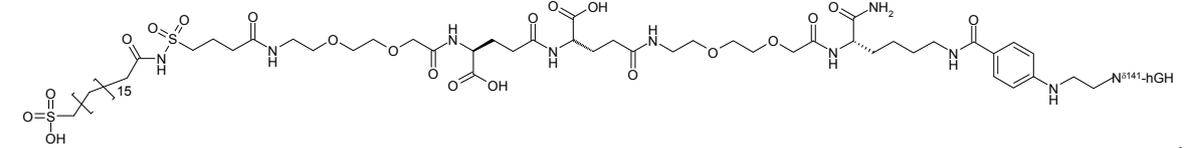
25



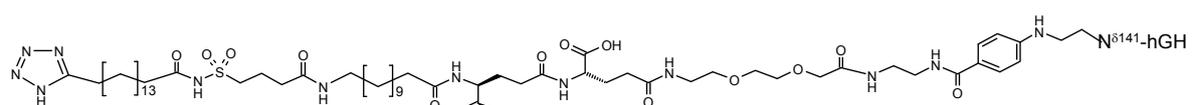
30



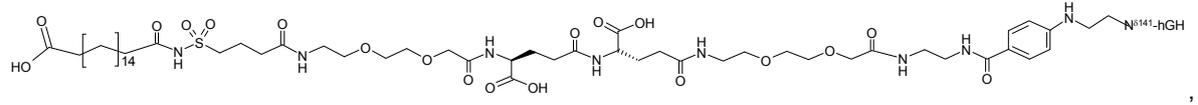
35



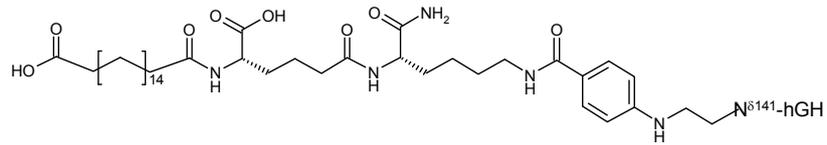
40



45

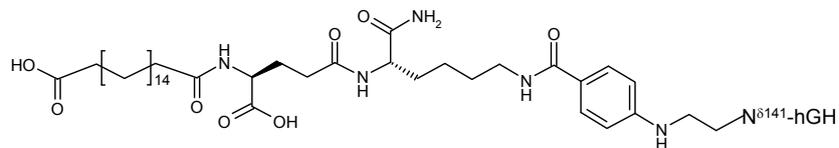


50



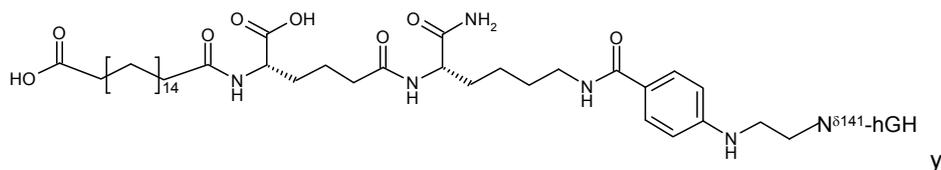
55

60



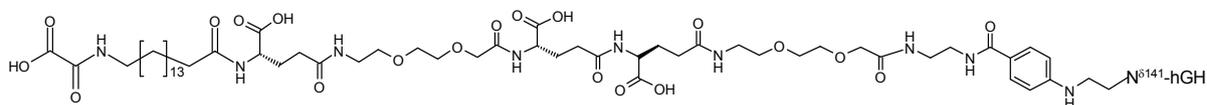
65

5



y

10



15

46. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45 para usar en la terapia.

20

47. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45 para usar en un método para tratar síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por HIV en niños que reciben tratamiento HAART (niños con HIV/HALS); niños que nacen pequeños para la edad gestacional (SGA); estatura pequeña en niños que nacen con muy bajo peso al nacer (VLBW) excepto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura pequeña idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en o de huesos largos, tal como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso, y dígitos; fracturas en o de huesos esponjosos, tal como el cráneo, base de la mano, y base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos en por ejemplo, la mano, rodilla, u hombro; pacientes que tienen o padecen de osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se han fijado materiales de osteosíntesis, como clavos, tornillos y placas; pacientes sin unión o con una mala unión de las fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo de la tibia o del 1^{er} dedo del pie; pacientes después de implante de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla provocada por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada con estado de mal nutrición en APCD; reversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; HIV en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función hepática afectada; hombres con infecciones por HIV; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a HIV (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de una cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/fármacos o trauma neurológico; envejecimiento; ancianidad débil; osteoartritis; cartílago con daño traumático; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; estatura pequeña debido al tratamiento con glucocorticoides en niños, la aceleración de la cicatrización de tejido muscular, tejido nervioso o heridas; la aceleración o mejora del flujo sanguíneo al tejido lesionado; o la disminución de la tasa de infección en tejido dañado.

40

48. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.

45

49. Un método de preparación de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45, el método comprende la introducción de un enlazador de unión a la albúmina a una hormona de crecimiento producida de manera recombinante o análogo de una hormona de crecimiento por medio del método de TGasa.

50

50. El uso de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45 en la producción de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD).

55

51. El uso de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-45 en la producción de un medicamento para el tratamiento de síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por HIV en niños que reciben tratamiento HAART (niños con HIV/HALS); niños que nacen pequeños para la edad gestacional (SGA); estatura pequeña en niños que nacen con muy bajo peso al nacer (VLBW) excepto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura pequeña idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en o de huesos largos, como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso, y dígitos; fracturas en o de huesos esponjosos, como el cráneo, base de la mano, y base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos en, por ejemplo, mano, rodilla, u hombro; pacientes que tienen o padecen de osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, tal como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material de osteosíntesis, como clavos, tornillos y placas; pacientes sin unión o con una mala unión de fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de tibia o del 1^{er} dedo del pie; pacientes después de implante de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla provocada por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (APCD); enfermedad

65

5 cardiovascular asociada con estado de mal nutrición en APCD; reversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; HIV en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función hepática afectada; hombres con infecciones por HIV; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a HIV (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/fármacos o trauma neurológico; envejecimiento; ancianidad débil; osteoartritis; cartílago con daño traumático; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; estatura pequeña debido al tratamiento con glucocorticoides en niños, la aceleración de la cicatrización de tejido muscular, tejido nervioso o heridas; la aceleración o mejora del flujo sanguíneo a un tejido dañado; o la disminución de la tasa de infección en tejido dañado.

15 La descripción en la presente de cualquier aspecto o modalidad de la invención mediante el uso de términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto o modalidad similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique de cualquier otra manera o que el contexto lo contradiga claramente (*por ejemplo*, una composición descrita en la presente como que comprende un elemento particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de cualquier otra manera o el contexto lo contradiga claramente).

20 La presente invención se ilustra, además, mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

25 Abreviaturas:

amu = unidades de masa atómica

hr(s) = hora(s)

30 Hz = hertz

l = litro(s)

35 M = molar

mbar = milibar

mg = miligramo(s)

40 min = minuto(s)

ml = mililitro(s)

mM = milimolar

45 mm = milímetro(s)

mmol = milimol(es)

50 nmol = nanomol(es)

mol = mol(es)

N = normal

55 nm = nanómetro(s)

seg = segundo(s)

ppm = partes por millón

60 ESI = ionización por electrospray

i.v. = vía intravenosa

65 m/z = relación de masa con relación a la carga

	MS = espectrometría de masas
	HPLC = cromatografía líquida de alta presión
5	RP = fase inversa
	HPLC-MS = cromatografía líquida de alta presión - espectrometría de masas
	NMR = espectroscopía de resonancia magnética nuclear
10	p.o. = por vía oral
	rt o RT = temperatura ambiente
15	s.c. = vía subcutánea
	tr = tiempo de retención
	Boc = <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
20	OtBu = éster <i>tert</i> butílico
	tBu = <i>tert</i> butilo
	Boc-4-ABZ-OH = ácido 4- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-benzoico
25	DCM = diclorometano, CH ₂ Cl ₂ , metilencloruro
	DIC = diisopropilcarbodiimida
30	DIPEA = N,N-diisopropiletilamina
	DMF = N,N-dimetilformamida
	DMSO = dimetilsulfóxido
35	DTT = ditioneitol
	EDAC = hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
40	Et ₂ O = éter dietílico
	EtOAc = acetato de etilo
45	Fmoc = 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
	Fmoc-Glu-O- <i>t</i> -Bu = éster N-Fmoc-ácido glutámico-1- <i>t</i> -butílico
	Fmoc-Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(difenil-p-tolil-metil)-amino]-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbo
50	nilamino)-ácido hexanoico
	Fmoc-OEG-OH = ácido (2[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi)acético
55	H ₂ O = agua
	HOBt = 1-hidroxibenzotriazol
	MeCN = acetonitrilo
60	MeOH = metanol
	NaCl = cloruro de sodio
	NaOH = hidróxido de sodio
65	NMP = N-metilpirrolidin-2-ona

OEG = ácido (2[2-(amino)etoxi]etoxi)acético

TFA = ácido trifluoroacético

5 THF = tetrahidrofurano

TIS = triisopropilsilano

CDCl₃ = cloroformo deuterio

10 CD₃OD = metanol tetradeuterio

DMSO-*d*₆ = dimetilsulfóxido de hexadeuterio

15 Los ejemplos también utilizan los siguientes métodos generales:

Método general para preparar compuestos de hGH.

20 El gen que codifica el compuesto de hormona de crecimiento se insertó de manera recombinante en un vector plasmídico. Una cepa de *E. coli* adecuada se transformó posteriormente mediante el uso del vector plasmídico. hGH o las variantes de GH pueden expresarse con una metionina N-terminal o como una fusión de MEAE de la cual la secuencia MEAE se escinde posteriormente.

25 La reserva de células se preparó en glicerol al 25 % y se almacenó a -80 °C. La cepa de reserva en glicerol se inoculó en placas con LB y posteriormente se incubaron a 37 °C durante la noche. El contenido de cada placa se lavó con medio LB y se diluyó en 500 ml de medio LB para determinar la expresión. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación a 220 rpm hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de 0,6. La inducción subsiguiente se realizó mediante el uso de IPTG 0,2 mM a 25 °C durante 6 hrs. Las células se cosecharon finalmente mediante centrifugación.

30 Las células se suspendieron posteriormente en Tris-HCl 10 mM, pH = 9,0 que contenía 0,05 % de Tween 20, EDTA 2,5 mM, cisteamina 10 mM y urea 4 M, y se lisaron con el uso de un disruptor de células a 30 kPSI. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación y posteriormente se sometió a purificación cromatográfica.

35 La purificación se realizó mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico e interacción hidrofóbica, seguido por eliminación del péptido etiqueta mediante el uso de dipeptidil peptidasa I humana (hDPPI) expresada a partir de célula CHO. La purificación final se logró mediante isoprecipitación y cromatografía de intercambio iónico. La purificación puede lograrse, además, mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y técnicas de separación basadas en membranas conocidas por un experto en la técnica.

40 Caracterización química de la proteína de los compuestos de hormona de crecimiento purificados.

45 La proteína purificada intacta se analizó mediante el uso de MALDI-MS. La masa observada correspondió a la masa teórica deducida a partir de la secuencia de aminoácidos.

Los enlaces de unión disulfuro esperados pueden demostrarse por mapeo de péptidos con el uso de digestión con tripsina y AspN seguido por análisis de MALDI-MS de la digestión antes y después de la reducción de los enlaces disulfuro con DTT.

50 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se llevó a cabo mediante el uso de un sistema Agilent Technologies 3DCE (Agilent Technologies). La adquisición de datos y el procesamiento de las señales se realizaron mediante el uso de Agilent Technologies 3DCE ChemStation. El capilar fue un "Capilar con trayecto de luz extendido" de 64,5 cm (56,0 cm de longitud eficiente) 50 µm i.d. de Agilent. La detección de UV se realizó a 200 nm (16 nm Bw, Referencia 380 nm y 50 nm Bw). El electrolito de la corrida fue tampón de fosfato 50 mM pH 7 (método A). El capilar se acondicionó con NaOH 0,1 M durante 3 min, después con agua Milli-Q durante 2 min y con el electrolito durante 3 min. Después de cada corrida, el capilar se enjuagó con agua milli-Q durante 2 min, después con ácido fosfórico durante 2 min, y con agua milli-Q durante 2 min. La inyección hidrodinámica se realizó a 50 mbar durante 4,0 seg. El voltaje fue +25 kV. La temperatura del capilar fue de 30 °C y el tiempo de corrida fue de 10,5 min.

Espectrometría de masa Maldi-Tof

65 Los pesos moleculares se determinaron mediante el uso del instrumento Autoflex Maldi-Tof (Bruker). Las muestras se prepararon mediante el uso de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico como matriz.

RP-HPLC

5 El análisis de RP-HPLC se realizó sobre un sistema Agilent 1100 mediante el uso de una columna de sílice C-18 Vydac 218TP54 4,6 mm x 250 mm 5 µm (The Separations Group, Hesperia). La detección fue mediante UV a 214 nm, 254 nm, 280 nm y 301 nm. La columna se equilibró con ácido trifluoroacético al 0,1 % / H₂O y la muestra se eluyó mediante un gradiente adecuado de 0 a 90 % de acetonitrilo contra ácido trifluoroacético al 0,1 % / H₂O.

LC-MS

10 El análisis de LC-MS se realizó en un espectrómetro de masas PE-Sciex API 100 o 150 equipado con dos microbombas Perkin Elmer Series 200, un muestreador automático Perkin Elmer Series 200, un detector de UV 785A de Applied Biosystems y un detector de dispersión de la luz Sedex 75 Evaporative. Una columna de sílice C-18 Waters Xterra 3,0 mm x 50 mm 5µ se eluyó a 1,5 ml/min a temperatura ambiente. Se equilibró con MeCN al 5 % / TFA al 0,1 % / H₂O y se eluyó durante 1,0 min con MeCN al 5 % / TFA al 0,1 % / H₂O y después con un gradiente lineal a MeCN al 90 % / TFA al 0,1 % / H₂O durante 7 min. La detección fue mediante detección de UV a 214 nm y dispersión de la luz Evaporative. Una fracción del eluato de la columna se introdujo en la interfaz de ionspray de un espectrómetro de masa PE-Sciex API 100. El intervalo de masas 300 - 2000 amu se escaneó cada 2 segundos durante la corrida.

Cuantificación de la proteína

20 Las concentraciones de proteína se estimaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm con el uso de un espectrofotómetro de UV NanoDrop ND-1000.

Mapeo enzimático de péptidos para la determinación de sitio(s) de derivación

25 El mapeo de péptidos se realizó mediante el uso de una digestión de Asp-N de la proteína reducida y alquilada. En primer lugar la proteína se trató con DTT y yodoacetamida de acuerdo con procedimientos estándares. El producto alquilado se purificó mediante el uso de HPLC. Posteriormente el producto purificado alquilado se digirió durante la noche con endoproteasa Asp-N (Boehringer) a una relación de enzima:sustrato de 1:100. La digestión se separó por HPLC mediante el uso de una columna C-18 y un sistema tampón de TFA/MeCN estándar. El mapa resultante del péptido se comparó con el de la hGH no derivada y se recolectaron fracciones con diferentes tiempos de retención y se analizaron adicionalmente mediante el uso de espectrometría de masa MALDI-tof.

SDS PAGE

35 La electroforesis en gel de poli-acrilamida y SDS se realizó mediante el uso de geles NuPAGE 4 % - 12 % Bis-Tris (Invitrogen NP0321BOX). Los geles se tiñeron con plata (Invitrogen LC6100) o se tiñeron con Coomassie (Invitrogen LC6065) y donde fue relevante también se tiñeron para PEG con yoduro de bario como se describe por M. M. Kurfurst en *Anal. Biochem.* 200(2), 244-248, (1992).

Cromatografía de proteínas

45 La cromatografía de proteínas se realizó en un sistema cromatográfico Äkta Explorer y columnas de GE Health Care. El intercambio aniónico se realizó mediante el uso de una columna Q-Sepharosa HP 26/10. El tampón de partida fue tampón de trietanolamina 20 mM pH 8,5 y el tampón de elución fue el tampón de partida + NaCl 0,2 M. Los compuestos se eluyeron típicamente con un gradiente de 0-75 % de tampón de elución con 15 volúmenes de columna. El desalado y el intercambio del tampón se realizó mediante el uso de una columna HiPrep 26/10.

50 La TGasa utilizada en los ejemplos es la transglutaminasa microbiana de *Streptovercillium mobaraense* de acuerdo con el documento US5156956.

Cálculo de LogP

55 Los valores de LogP pueden calcularse como mLogP y/o cLogP para la parte de unión a la albúmina y/o la parte del espaciador hidrofílico mediante el uso de algoritmos publicados (*J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 5175-5180 "A New Substituent Constant, χ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski y otros. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1997) 3-25, "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" e I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, *Chem. and Pharm. Bull.*, 42 (1994) 976-978 "Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods". En la presente descripción clogP - logP de Pomona College (coeficiente de reparto en octanol/agua) se calcula con Sybyl 7.0 de Tripos (<http://www.tripos.com>) versión 4.2 del algoritmo de clogP y versión 22 de su fragmento de base de datos asociada como se proporciona por BioByte Corp (<http://www.biobyte.com/>).

65 Ensayo (I) Ensayo en BAF-3GHR para determinar la actividad de hormona de crecimiento

Las células BAF-3 (una línea murina de células linfoides pro-B derivada de la médula ósea) eran originalmente dependientes de IL-3 para el crecimiento y la supervivencia. IL-3 activa JAK-2 y STAT que son los mismos mediadores que la GH activa después de la estimulación. Después de la transfección del receptor de la hormona de crecimiento humana la línea celular se convirtió en una línea celular dependiente de la hormona de crecimiento. Este clon puede utilizarse para evaluar el efecto de diferentes muestras de hormona de crecimiento sobre la supervivencia de BAF-3GHR.

Las células BAF-3GHR se cultivan en medio de privación (medio de cultivo sin hormona de crecimiento) durante 24 horas a 37°C, CO₂ al 5 %.

Las células se lavan y resuspenden en medio de privación y se siembran en placas. Se añaden 10 µl del compuesto de hormona de crecimiento u hormona de crecimiento humana en diferentes concentraciones o control a las células, y las placas se incuban durante 68 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Se añade AlamarBlue® a cada pocillo y las células se incuban después durante otras 4 horas. AlamarBlue® es un indicador redox, y se reduce por reacciones innatas al metabolismo celular y, por lo tanto, proporciona una medida indirecta de la cantidad de células viables.

Finalmente, la actividad metabólica de las células se mide en un lector de fluorescencia de placas. La absorbancia en las muestras se expresa en % de células no estimuladas con compuesto de hormona de crecimiento o control y a partir de las curvas de concentración-respuesta puede calcularse la actividad (cantidad de un compuesto que estimula las células con 50 %).

Ensayo para medir la tasa de degradación por proteasas de la GH y conjugados de compuestos de hGH

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

Digestión proteolítica:

100 µl de una solución de un compuesto de prueba a 1 mg/ml en tampón de bicarbonato de amonio es degradado por la enzima durante hasta 24 hrs a 37°C. Se toman sub-muestras a diversos puntos de tiempo y la reacción proteolítica se detiene mediante acidificación de la muestra en una dilución de 10 veces en TFA al 1 %. Estas muestras diluidas se analizan mediante HPLC de fase inversa para estimar el grado de digestión proteolítica.

Método de HPLC:

Se inyectan 10 µl de la solución anterior en una columna Vydac C4 2x150 mm de fase inversa eluída con un gradiente lineal de TFA al 0,1 % en agua a acetonitrilo al 100 % que contenía TFA al 0,1 % durante un periodo de 30 min a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. La detección de picos se realiza a 214 nm de absorción UV. El porcentaje (%) del compuesto intacto en el punto de tiempo t=T se calcula a partir del área del pico en el punto de tiempo t=T (A_T) y el área del pico a t=0 (A₀) como (A_T/A₀)x100 %. El porcentaje (%) del compuesto intacto se lleva a un gráfico contra el tiempo mediante el uso del programa informático GraphPad Prism ver. 5.01. El tiempo de vida media (T_{1/2}) se calcula como una disminución de fase también mediante el programa informático GraphPad Prism. Ejemplos de enzimas que pueden usarse son elastasa (pancreasa porcina de Sigma) y quimotripsina (grado de secuenciación de Roche). Un ejemplo de tampón es bicarbonato de amonio 50 mM, pH = 8,5.

Farmacocinética

La farmacocinética de los compuestos de los ejemplos se investiga en ratas Sprague Dawley, machos, después de una administración de dosis única intravenosa (i.v.) y/o subcutánea (s.c.).

Los compuestos de prueba se diluyen a una concentración final de 1 mg/ml en un tampón de dilución que consiste en: Glicina 20 mg/ml, manitol 2 mg/ml, NaHCO₃ 2,5 mg/ml, con ajuste del pH a 8,2.

Los compuestos de prueba se estudian en ratas Sprague Dawley machos que pesan 250 g. Los compuestos de prueba se administran como una inyección única ya sea por vía i.v. en la vena de la cola o s.c. en el cuello con una aguja 25 G a una dosis de 60 nmol/kg de peso corporal.

Para cada compuesto de prueba el muestreo de sangre se realiza de acuerdo con el siguiente programa presentado en la tabla 1.

Tabla 1. Programa del muestreo de sangre para cada compuesto de prueba.

5	Animal núm.	Vía de admin.	Tiempo de muestreo (h)														
			Predosis	0,08	0,25	0,5	1	2	4	6	8	18	24	48	72		
	1	s.c.							X	X	X		X	X	X		
	2									X	X	X		X	X	X	
10	3				X	X	X	X									
	4				X	X	X	X									
	5			X									X				
	6			X									X				
15	7		i.v.				X	X			X	X		X	X	X	
	8						X	X			X	X		X	X	X	
	9			X	X									X			
20	10			X	X									X			

En cada tiempo de muestreo se extraen 0,25 ml de sangre de la vena de la cola mediante el uso de una aguja 25 G. Las muestras de sangre se toman en un tubo de ensayo revestido de EDTA y se almacenan en hielo hasta la centrifugación a 1200 x G durante 10 min a 4 °C. El plasma se transfiere a un tubo Micronic y se almacena a -20 °C hasta su análisis.

Las concentraciones del compuesto de prueba se determinan mediante un ELISA sándwich con el uso de un anticuerpo policlonal anti-hGH de cobayo como receptor, y proteína de unión a hGH biotinilada (parte soluble del receptor de GH humana) como detector. El límite de detección del ensayo fue de 0,2 nM.

Un análisis farmacocinético no compartimental se realiza en los perfiles de concentración media-tiempo de cada compuesto de prueba mediante el uso de WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos). Se calculan los estimados de parámetros farmacocinéticos del tiempo de vida media terminal ($t_{1/2}$) y tiempo medio de residencia (MRT).

Estudio de dosis-respuesta *in vivo* en ratas Sprague Dawley con remoción quirúrgica de la hipófisis

La relación de dosis-respuesta *in vivo* se estudia en ratas Sprague Dawley, machos, con remoción quirúrgica de la hipófisis. La rata con remoción quirúrgica de la hipófisis es un modelo animal de deficiencia de la hormona de crecimiento bien conocido y reconocido, donde no hay producción de la hormona de crecimiento después de la eliminación quirúrgica de la glándula pituitaria. Esto conduce además a bajos niveles circulantes del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) otra importante característica clínica de la deficiencia de la hormona de crecimiento en seres humanos.

La hipofisectomía se realiza en ratas machos de 4 semanas de edad con peso de 90-100 g. Los animales entran en el estudio de 3 a 4 semanas después de la cirugía con peso de 100-110 g. Los animales con ganancia de peso corporal de más del 10 % durante las 3-4 semanas después de la cirugía no entran en el estudio.

Los estudios de dosis respuesta se realizan usualmente con el uso de cinco niveles de dosis del compuesto de prueba a partir de 1-150 nmol/rata.

Eliminación

Las velocidades de eliminación pueden medirse en cerdos, usualmente al menos cinco cerdos hembra de LYD cruzado. Los cerdos se pesan, se someten a ayuna y se les coloca una "chaqueta para cerdos" especial para portar el contador y transmisor gamma y se sitúan en corrales individuales antes del inicio del estudio. Todos los cerdos se someten a ayuna durante 18 horas antes del estudio.

Los animales se dosifican (60 nmol) por vía subcutánea en el lado izquierdo y derecho del cuello respectivamente con una aguja 28G Novopen3® y una NovoFine® con tope negro y fino para la aguja. La profundidad de la inyección es de 5 mm. Las soluciones de prueba (que incluyen los compuestos) se diluyen en un tampón que consiste en: Glicina 20 mg/ml, manitol 2 mg/ml, NaHCO₃ 2,4 mg/ml, con ajuste del pH a 8,2.

La yodinación con ¹²⁵I se realiza por Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S. La formulación radioactiva final tiene una actividad radioactiva específica de 3 µCi/ml y se proporciona

en 3 ml de Penfills. Las soluciones se almacenaron a 2-8°C hasta su uso.

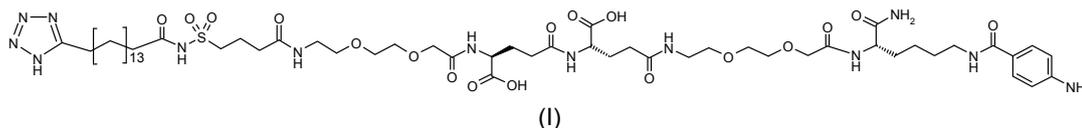
La eliminación de los depósitos radioactivos se mide mediante un equipo portable durante aproximadamente 24-48 horas.

5

Preparación de grupos de unión a albúmina

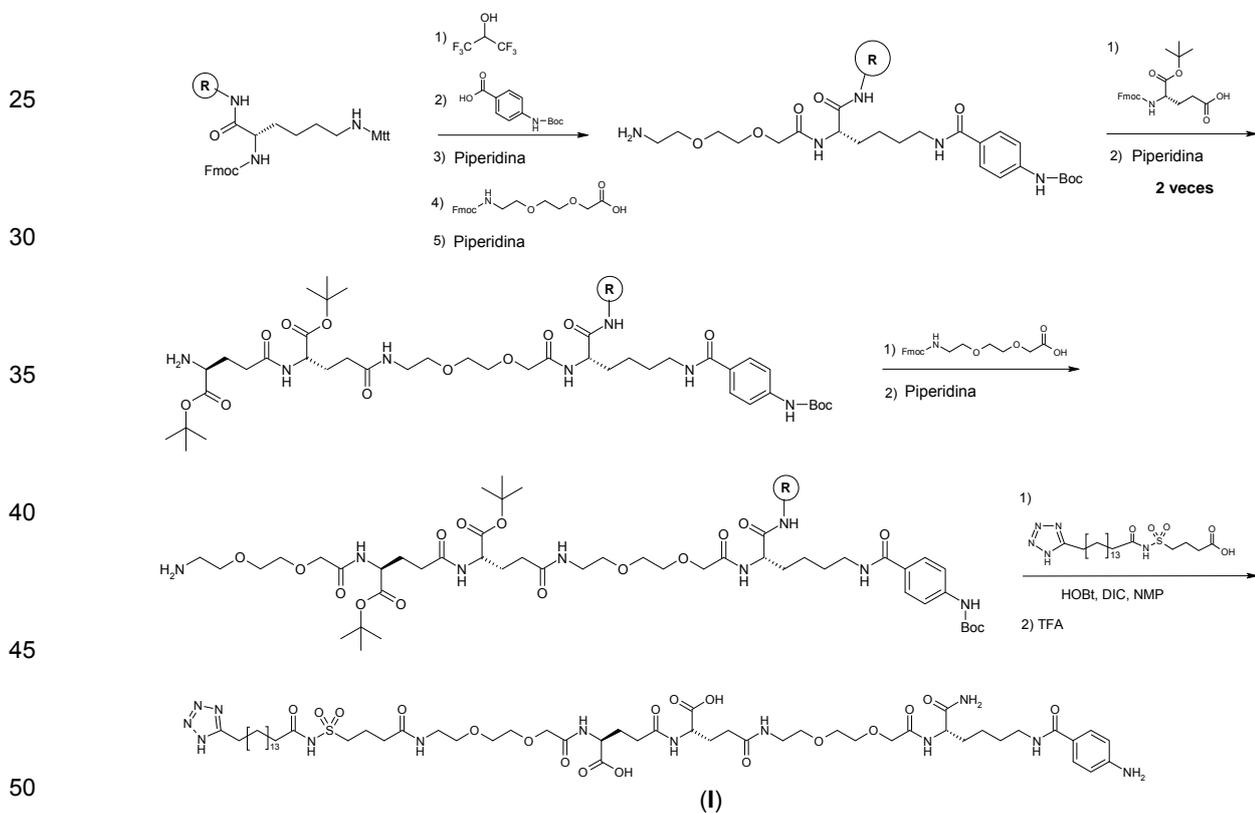
Ejemplo 1

10 Enlazador OEG de tetrazol (I):



El enlazador OEG de tetrazol (I) se sintetizó de acuerdo con el esquema 1.

20 Esquema 1.



Se pesaron 2 g de resina de amida de Rink (2 g, 0,6 mMol/g) en un matraz. La resina se hinchó con NMP (3 x 30 ml) durante 2 hrs.

55

Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (30 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (30 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 30 ml).

60

En un matraz se pesaron Fmoc-Lys(Mtt)-OH y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (30 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada anteriormente seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 30 ml) seguido por lavado con DCM (3 x 30 ml).

ES 2 703 388 T3

La resina se trató con hexafluorisopropanol (20 ml) durante 10 min. Se agitó durante 10 min. La resina se drenó y se lavó con DCM (3 x 30 ml). La resina se trató con hexafluorisopropanol (20 ml) durante 10 min de nuevo y se agitó durante 10 min. La resina se drenó y se lavó con DCM (3 x 30 ml) seguido por drenaje y lavado con NMP (3 x 30 ml).

5 En un matraz se pesaron Boc-4-ABZ-OH y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (30 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada anteriormente seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 30 ml).

10 Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

15 En un matraz se pesaron Fmoc-OEG-OH y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (15 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 23 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml).

Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

20 En un matraz se pesaron Fmoc-Glu-O-*t*-Bu y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (15 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml).

25 Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

30 En un matraz se pesaron Fmoc-Glu-O-*t*-Bu y HOBT, se disolvieron en 15 ml de bromo fenol azul 0,5 mM en NMP. Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml).

35 Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

En un matraz se pesaron Fmoc-OEG-OH y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (15 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente.

La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml).

40 Eliminación del grupo Fmoc: La resina se agitó con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 10 min. La resina se drenó y se trató con piperidina al 25 % en NMP (10 ml) durante 1 hora seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

45 En un matraz se pesaron ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)-butírico y HOBT, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (15 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml NMP) seguido por drenaje y lavado con DCM (6 x 15 ml).

50 La resina se escindió con una mezcla de TFA al 95 % en agua (10 ml) + DCM (0,25 ml) y TIPS (0,25 ml). La resina se agitó durante 2 hrs a temperatura ambiente y se filtró en éter dietílico frío (75 ml). El precipitado resultante se aisló mediante centrifugación seguido por lavado con éter dietílico (3 x) y se secó a vacío durante 48 hrs para producir 300 mg del compuesto crudo.

55 TOF-MS: Rt = 4,7 min, masa 1268,71

El compuesto crudo se purificó en HPLC-prep (GILSON). T2145-10; 30->MeCN al 80 %. Las fracciones mezcladas se evaporaron hasta la sequedad en un rotavapor y el residuo se disolvió en H₂O / MeCN 1:1 y se liofilizó durante la noche para producir 170 mg del compuesto.

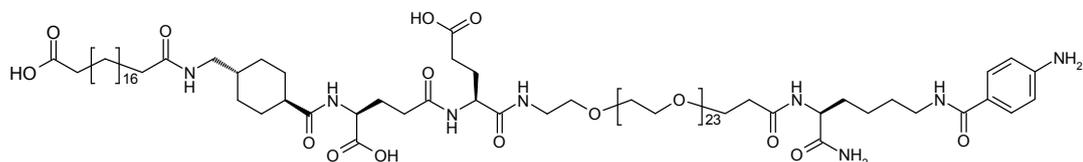
60 Ejemplo 2

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de Wang.

65

Ejemplo 6

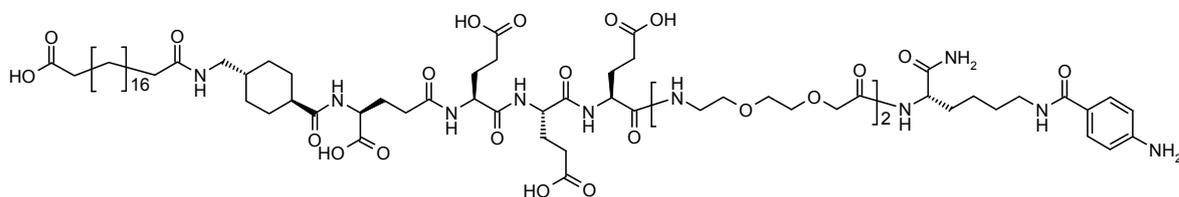
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.



TOF-MS: masa 2114,64

Ejemplo 7

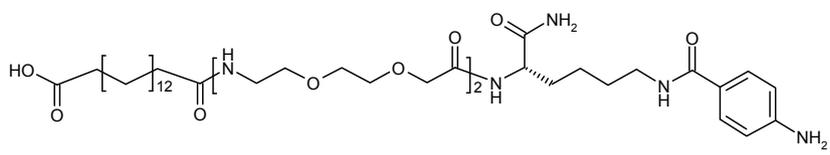
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.



TOF-MS: masa 1534,82

Ejemplo 8

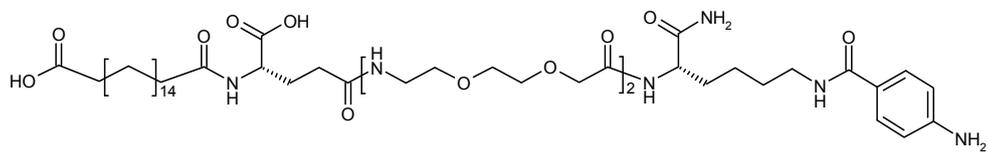
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.



TOF-MS: masa 823,05

Ejemplo 9

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y Resina de Wang.

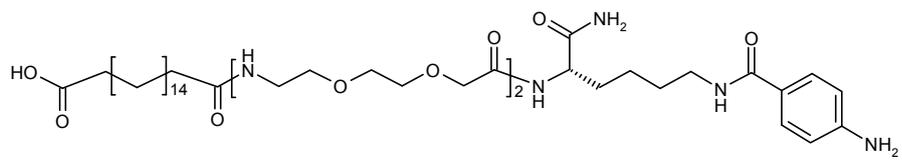


TOF-MS: masa 980,22

Ejemplo 10

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

5



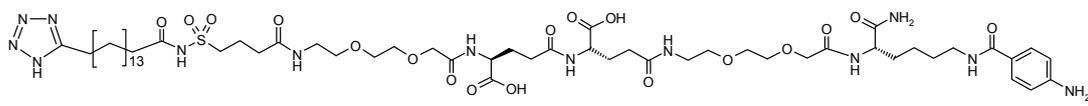
TOF-MS: masa 851,10

10

Ejemplo 11

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

15



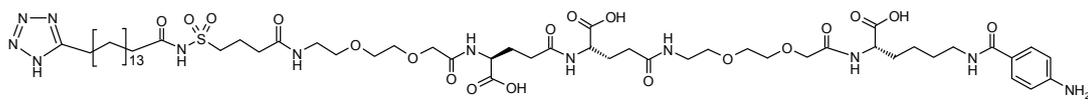
20

TOF-MS: masa 1258,51

Ejemplo 12

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y Resina de Wang.

25



30

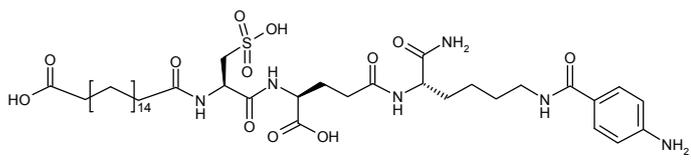
TOF-MS: masa 1269,49

35

Ejemplo 13

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

40



45

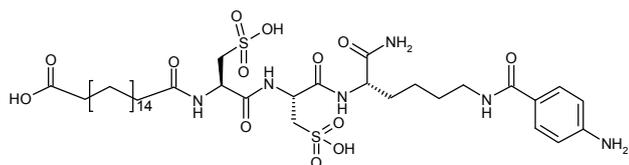
TOF-MS: masa 841,04

50

Ejemplo 14

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

55



60

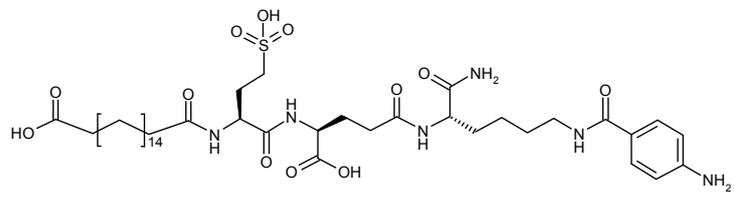
Masa calculada 863,07

Ejemplo 15

65

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

5



10

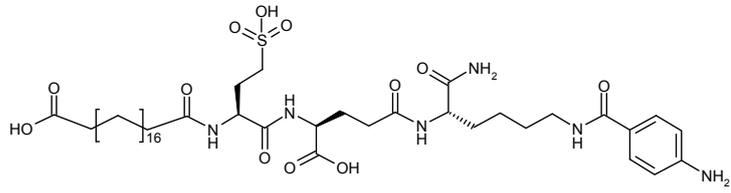
Masa calculada 855,07

Ejemplo 16

15

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

20



25

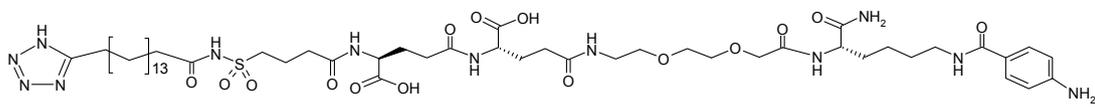
Masa calculada 883,12

Ejemplo 17

30

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

35



40

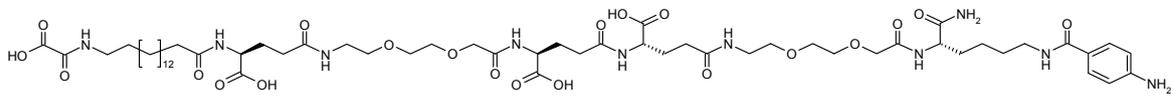
TOF-MS: masa 1123,35

Ejemplo 18

45

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

50



55

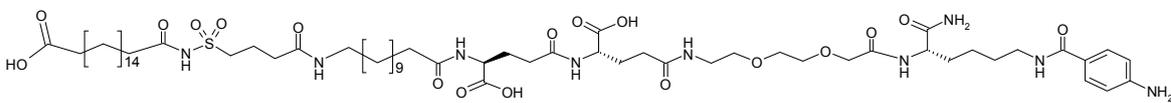
TOF-MS: Rt = 4,7 min, masa 1267,45

Ejemplo 19

60

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

65



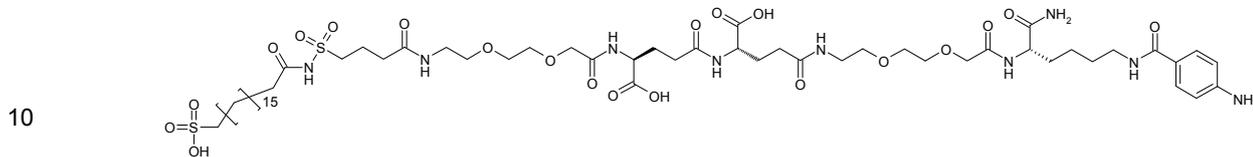
65

TOF-MS: masa 1310,67

Ejemplo 20

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

5



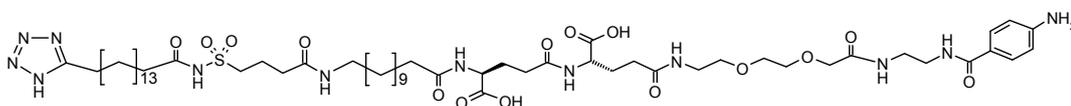
10

Masa calculada 1308,58

Ejemplo 21

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.

20



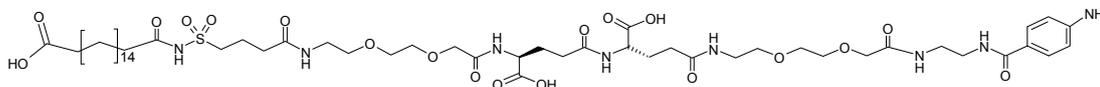
25

Masa calculada: 1235,56

Ejemplo 22

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.

35

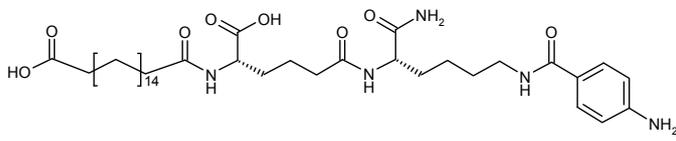


Masa calculada: 1173,40

Ejemplo 23

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

45



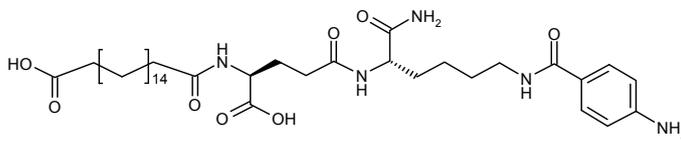
50

TOF-MS: masa 703,93

Ejemplo 24

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

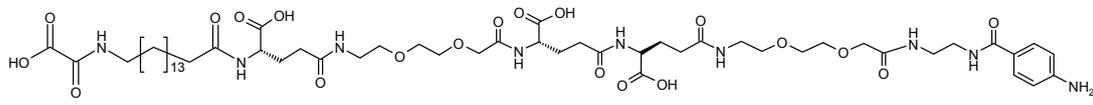
60



Masa calculada 689,90

Ejemplo 25

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 1 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.



Masa calculada 1182,34

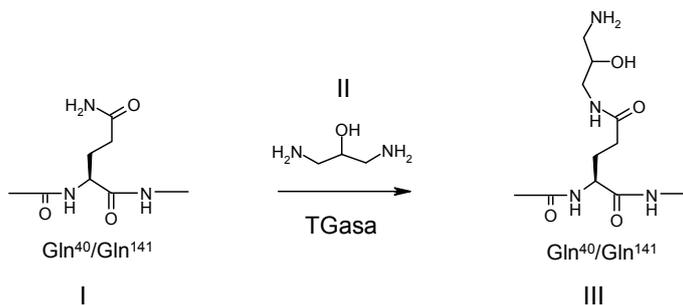
Preparación de compuestos de GH de unión a albúmina

Ejemplo 26

1. Acoplamiento del grupo de unión a la albúmina de fórmula general A-W-B1-NH₂ al compuesto de GH transaminado y oxidado (I)

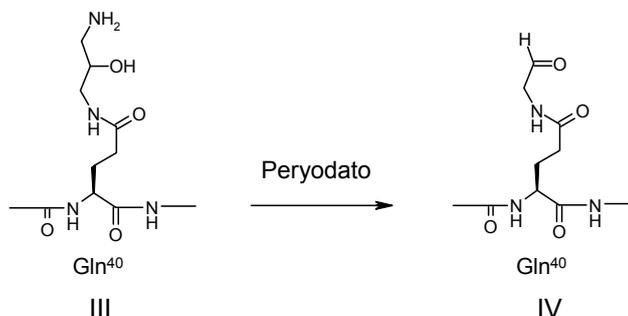
El uso de una transglutaminasa para unir un asidero de aldehído a la GH en residuos de glutamina se ha descrito previamente en el documento WO2005/070468. El método puede usarse de acuerdo con la presente invención para la unión de un enlazador basado en un grupo de unión a la albúmina de fórmula A-W-B1-NH₂. La TGasa usada es la transglutaminasa microbiana de *Streptovercillium mobaraense* de acuerdo con el documento US5156956.

La reacción puede realizarse de la siguiente manera: GH (I) se transamina inicialmente con 1,3-diamino-2-propanol (II) como se describe en el documento WO2005/070468:



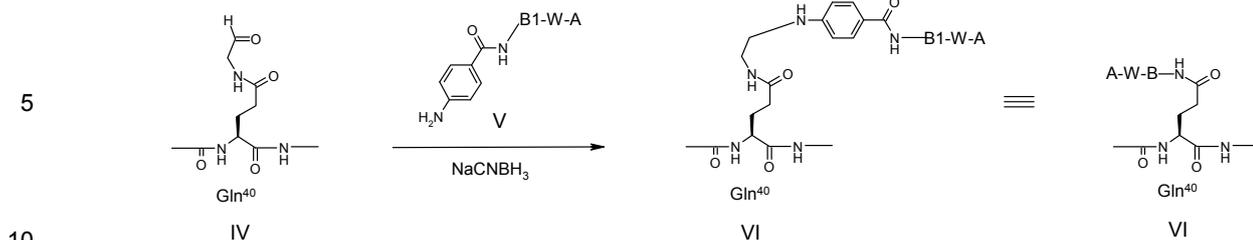
En la próxima etapa, a la GH transaminada (III) se añade peryodato. La oxidación se realiza típicamente a temperatura baja, como 4-10 °C durante 30 min. opcionalmente en la oscuridad. El peryodato puede oxidar residuos de metionina en GH a sus correspondientes residuos de metionina sulfóxido. Para minimizar este riesgo de oxidación, pueden añadirse tioéteres orgánicos de molécula pequeña durante la oxidación de peryodato. Un tioéter orgánico adecuado es 3-metiltiopropan-1-ol pero el experto será capaz de sugerir otros.

Oxidación de un compuesto de GH transaminado (III):



El cambio de tampón puede realizarse para obtener una solución ácida requerida para la reducción eficiente con ciano borohidruro de sodio. Típicamente, se usa un exceso de A-W-B1-NH₂ amina, y puede añadirse cianoborohidruro de sodio en porciones más pequeñas en el tiempo.

Aminación reductiva de (IV) con un enlazador del grupo de unión a la albúmina (V):



La última reacción puede realizarse de la siguiente manera:

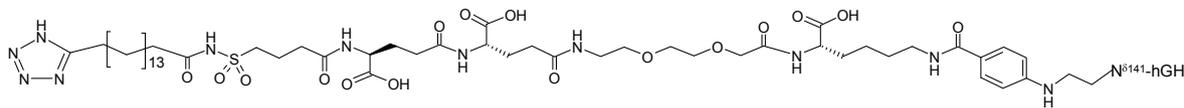
15 A una solución de GH transaminada oxidada (IV) se añade una solución del enlazador del grupo de unión a la albúmina (V) en una mezcla de AcOH (1,5 ml) y MES 50 mM (0,5 ml) a pH 6,00. La mezcla de reacción resultante se agita suavemente a RT durante 30 min. en cuyo tiempo se añade una solución de NaCNBH₃ (15 µl, (22 mg de NaCNBH₃ disuelto en 500 µl de agua Milli-Q + AcOH (15 µl))). La muestra se cubre con una lámina de estaño y se agita durante la noche a RT.

20 El conjugado puede aislarse mediante cromatografía de intercambio aniónico de la siguiente manera:

25 El ácido acético se elimina mediante cambio del tampón con agua pura (3X) con el uso de dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) mediante centrifugación a 4000 rpm/min. durante 3 x 8 min. Después a la mezcla se le cambia el tampón a TEA 20 mM, pH: 8,50 mediante el uso de dispositivos de filtro Amicon y se diluye a un volumen final de 50 ml con TEA 20 mM, antes de cargarla en una columna HiLoad Q Sefarosa, 26/10. La columna se lava inicialmente con TEA 20 mM, pH 8,50 (tampón A) y después se eluye con TEA 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,50 (tampón B) mediante el uso de un gradiente de 0-100 % (B) en 20 CV, con una velocidad de flujo de 2 ml/min. El tampón de las fracciones mezcladas se cambió 5 veces a tampón de amoniobicarbonato 10 mM en agua pura con el uso de dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) mediante centrifugación a 4000 rpm/min. durante 3 x 8 min

30 Ejemplo 27

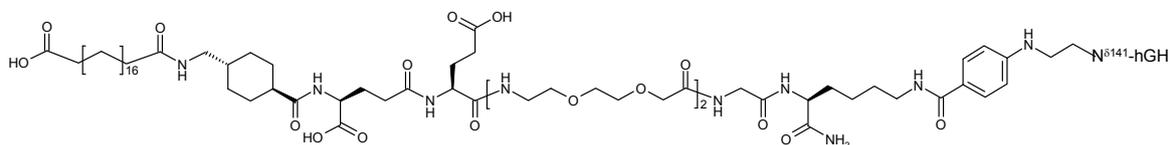
35 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 2.



40 Masa calculada 23 473,81

45 Ejemplo 28

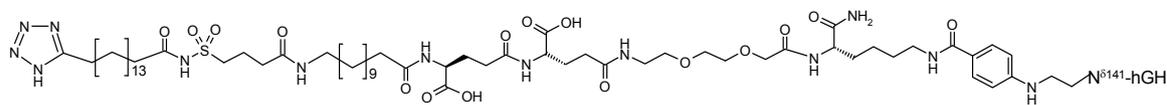
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 4.



55 TOF-MS: masa 23,428

Ejemplo 29

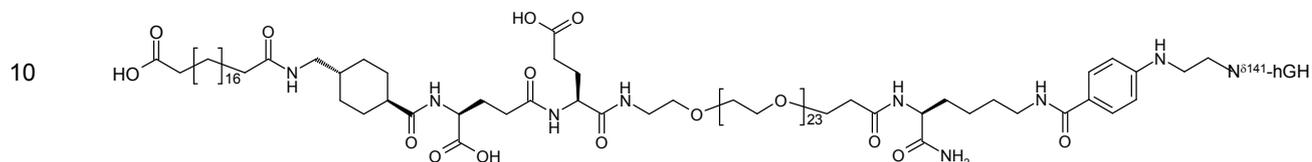
60 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 5.



TOF-MS: masa 23 472,40

Ejemplo 30

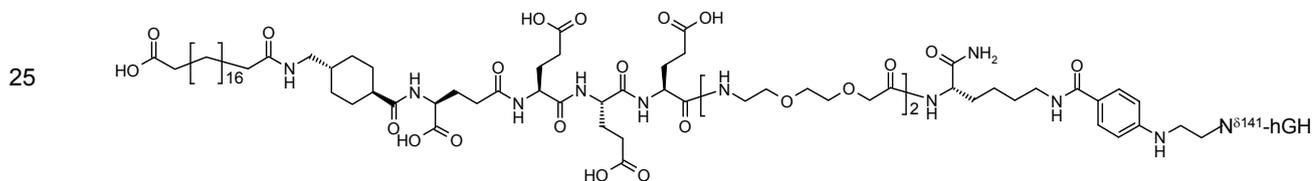
5 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 6.



15 TOF-MS: masa 24 265,71

Ejemplo 31

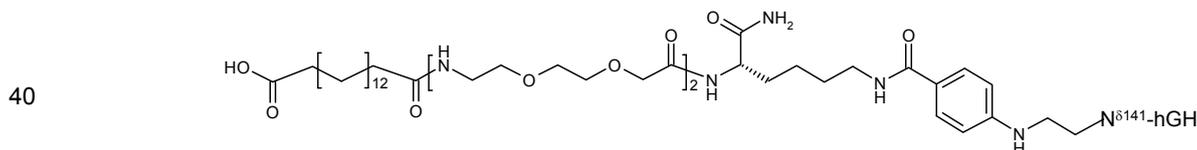
20 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 7.



30 TOF-MS: masa 23 686,83

Ejemplo 32

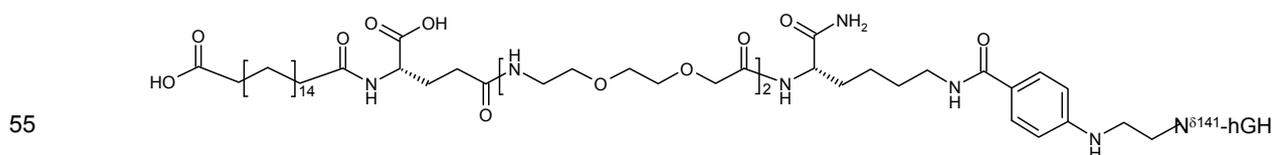
35 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 8.



45 TOF-MS: masa 22 974,75

Ejemplo 33

50 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 9.



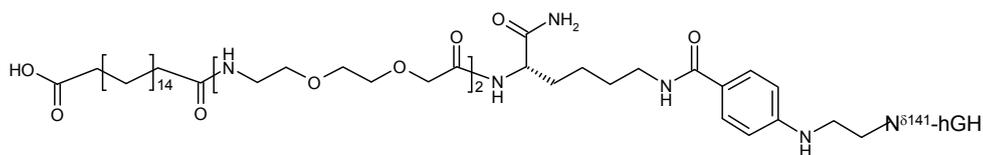
60 TOF-MS: masa 23 131,31

Ejemplo 34

65 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 10.

65

5

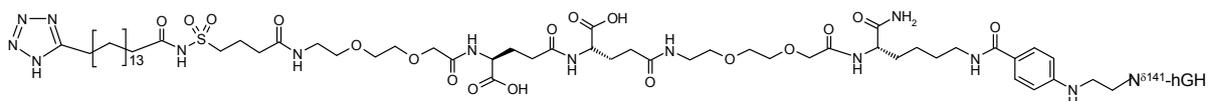


TOF-MS: masa 23 002

10 Ejemplo 35

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 11.

15

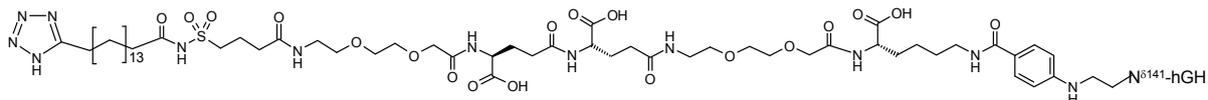


20 TOF-MS: masa 23 419,59

Ejemplo 36

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 12.

30

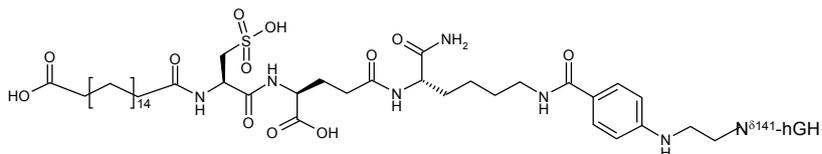


TOF-MS: masa 23 420,58

35 Ejemplo 37

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 13.

40



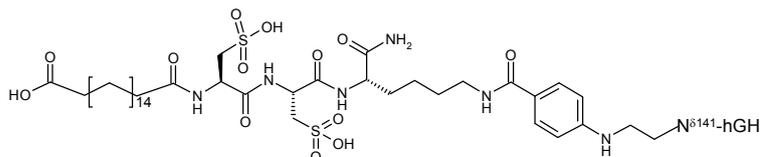
45

TOF-MS: masa 22 992,13

50 Ejemplo 38

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 14.

55



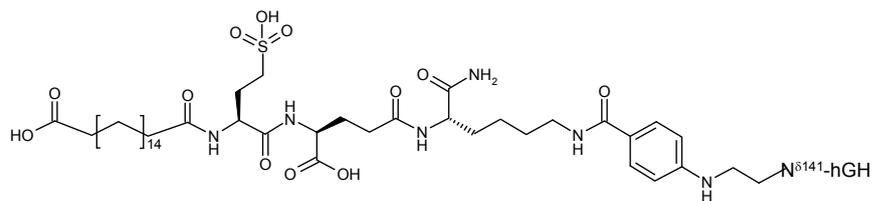
60

Masa calculada 23 015,15

Ejemplo 39

65 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 15.

5

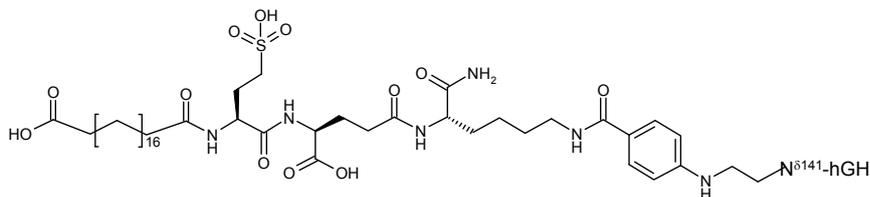


10 Masa calculada 23 006,15

Ejemplo 40

15 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 16.

20



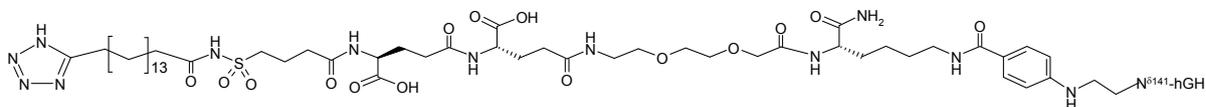
25

Masa calculada 23 034,18

Ejemplo 41

30 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 17.

35

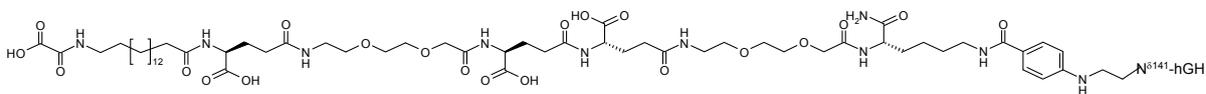


TOF-MS: masa 23 273,97

40 Ejemplo 42

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 18.

45

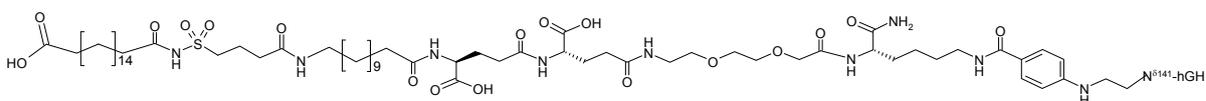


50 TOF-MS: masa 23 333

Ejemplo 43

55 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 19.

60

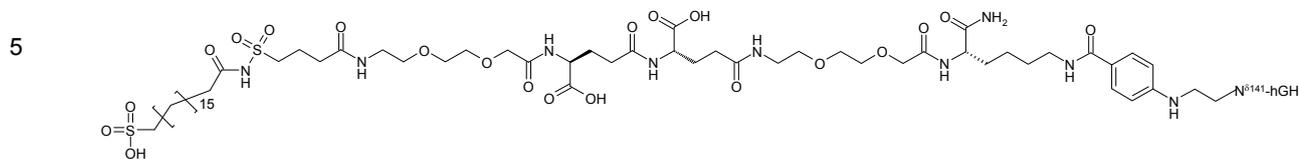


Masa calculada 23 461,75

Ejemplo 44

65

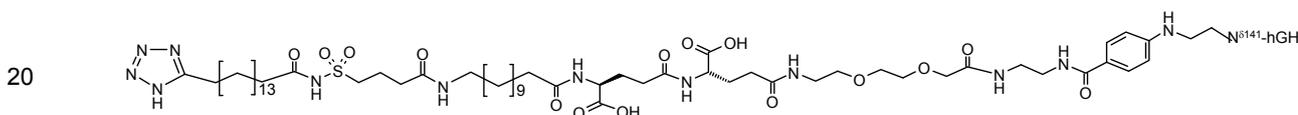
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 20.



10 Masa calculada 23 459,67

Ejemplo 45

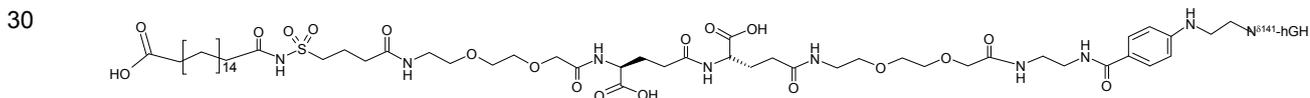
15 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 21.



Masa calculada 23 386,65

25 Ejemplo 46

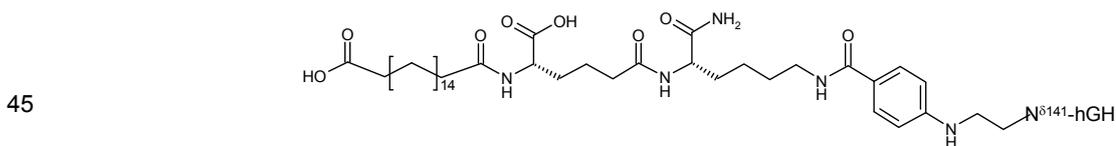
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 22.



35 Masa calculada 23 324,48

Ejemplo 47

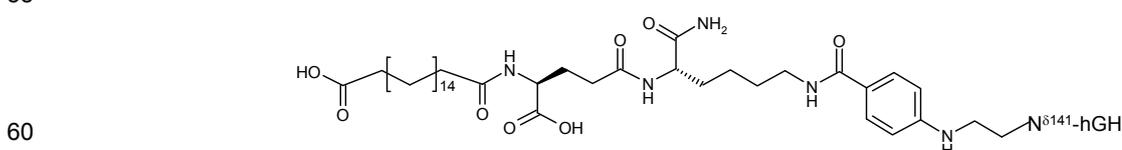
40 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 23.



50 TOF-MS: masa 22 841

Ejemplo 48

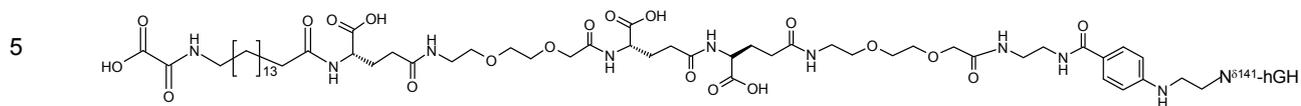
55 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 24.



Masa calculada 22 826,97

65 Ejemplo 49

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 26 anterior el siguiente compuesto puede prepararse mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 25.



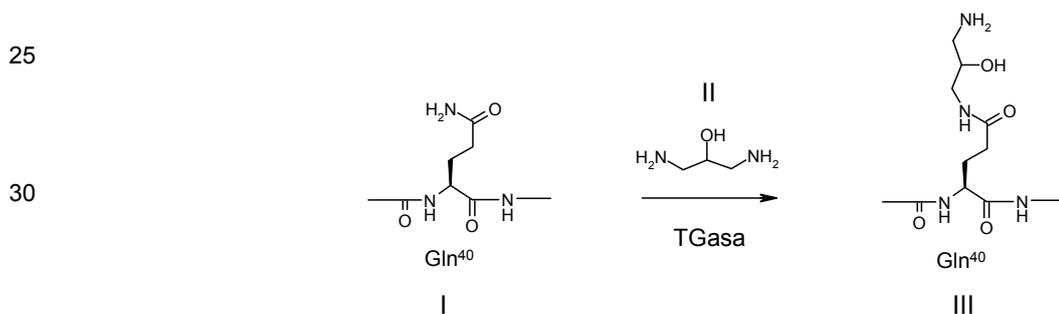
Ejemplo 50

10 Acoplamiento de un enlazador de unión a la albúmina de fórmula general A-W-B1-NH₂ al compuesto de GH transaminado y oxidado (I)

15 El uso de una transglutaminasa para unir un asidero de aldehído a la GH en residuos de glutamina se ha descrito previamente en el documento WO2005/070468. El método puede usarse de acuerdo con la presente invención para la unión de un enlazador basado en un grupo de unión a la albúmina de fórmula A-W-B1-NH₂. La TGasa usada es la transglutaminasa microbiana de *Streptovorticillium mobaraense* de acuerdo con el documento US5156956.

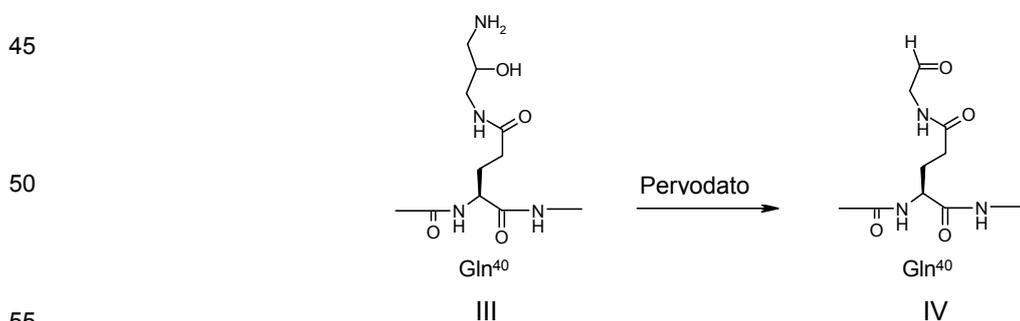
20 La reacción puede realizarse de la siguiente manera: GH (I) se transamina inicialmente con 1,3-diamino-2-propanol (II) como se describe en el documento WO2005/070468:

25 La hGH transaminada Gln⁴⁰ (III) se obtuvo a partir del ejemplo 26 como un subproducto de la purificación por cromatografía de CIE.



40 En la próxima etapa, a la GH transaminada (III) se añade peryodato. La oxidación se realiza típicamente a temperatura baja, como 4-10 °C durante 30 min. opcionalmente en la oscuridad. El peryodato puede oxidar residuos de metionina en GH a sus correspondientes residuos de metionina sulfóxido. Para minimizar este riesgo de oxidación, pueden añadirse tioéteres orgánicos de molécula pequeña durante la oxidación de peryodato. Un tioéter orgánico adecuado es 3-metiltiopropán-1-ol pero el experto será capaz de sugerir otros.

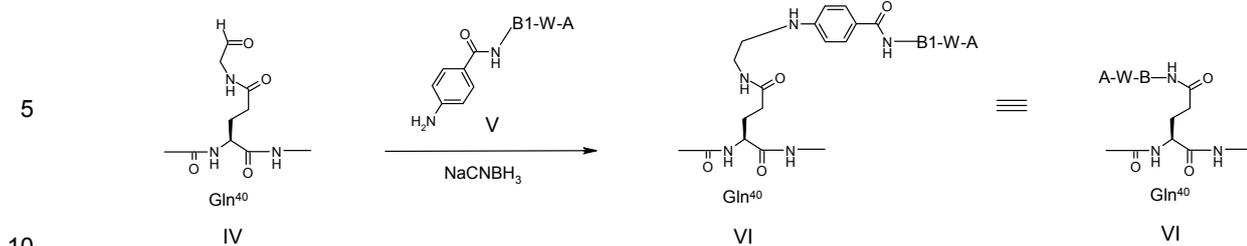
Oxidación de un compuesto de GH transaminado (III):



60 El cambio de tampón puede realizarse para obtener una solución ácida requerida para la reducción eficiente con ciano borohidruro de sodio. Típicamente, se usa un exceso de A-W-B1-NH₂ amina, y puede añadirse cianoborohidruro de sodio en porciones más pequeñas en el tiempo.

Aminación reductiva de (IV) con un enlazador del grupo de unión a la albúmina (V):

65



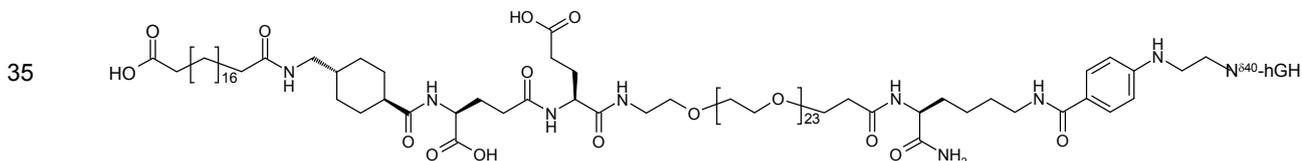
La última reacción puede realizarse de la siguiente manera:

15 A una solución de GH transaminada oxidada (IV) se añade una solución de enlazador de ácido biliar (V) en una mezcla de AcOH (1,5 ml) y MES 50 mM (0,5 ml) a pH 6,00. La mezcla de reacción resultante se agita suavemente a RT durante 30 min. en cuyo tiempo se añade una solución de NaCNBH₃ (15 µl, (22 mg de NaCNBH₃ disuelto en 500 µl de agua Milli-Q + AcOH (15 µl))). La muestra se cubre con una lámina de estaño y se agita durante la noche a RT.

20 El conjugado puede aislarse mediante cromatografía de intercambio aniónico de la siguiente manera:

25 El ácido acético se elimina mediante cambio del tampón con agua pura (3X) con el uso de dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) mediante centrifugación a 4000 rpm/min. durante 3 x 8 min. Después a la mezcla se le cambia el tampón a TEA 20 mM, pH: 8,50 mediante el uso de dispositivos de filtro Amicon y se diluye a un volumen final de 50 ml con TEA 20 mM, antes de cargarla en una columna HiLoad Q Sefarosa, 26/10. La columna se lava inicialmente con TEA 20 mM, pH 8,50 (tampón A) y después se eluye con TEA 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,50 (tampón B) mediante el uso de un gradiente de 0-100 % (B) en 20 CV, con una velocidad de flujo de 2 ml/min. El tampón de las fracciones mezcladas se cambió 5 veces a tampón de amoniobicarbonato 10 mM en agua pura con el uso de dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) mediante centrifugación a 4000 rpm/min. durante 3 x 8 min

30 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 50 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina a partir del ejemplo 6.

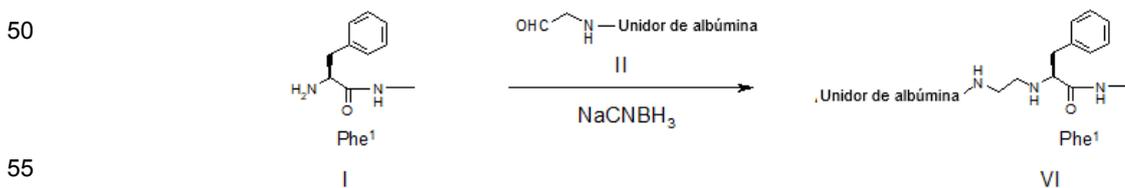


40 TOF-MS: Rt = 4,7 min, masa 23 473,81

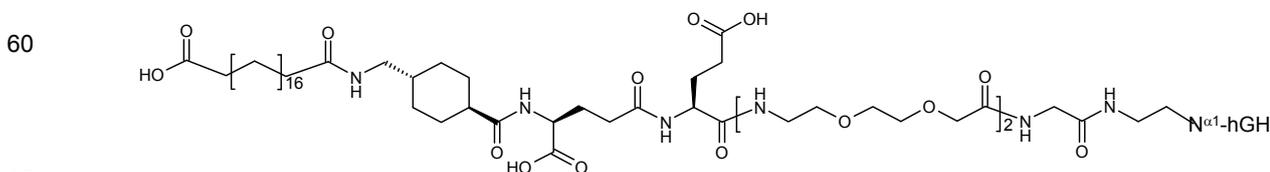
Ejemplo 51

45 1. Acoplamiento de un compuesto de GH (I) N-terminalmente con un grupo de unión a la albúmina (II)

(A) Alquilación reductiva de (I) con un aldehído de unión a la albúmina (II)



El grupo de unión a la albúmina (II) se obtuvo como se describe en el ejemplo 3.



2-(C₂₀diácido-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Glicina amida)-etil-Nα¹-hGH

hGH (23 mg) se disolvió en tampón Hepes (2,3 ml 0,25 mM pH 7,0).

5 C₂₀diácido-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-dimetilacetal (2 mg, véase el ejemplo 3 anterior) se trató con TFA (50 μl) durante 6 min. y se evaporó hasta la sequedad en vacío. El residuo se extrajo de nuevo con EtOH (200 μl) y se evaporó hasta la sequedad a vacío. El residuo se disolvió en DMF (100 μl) y se añadió a la solución de hGH. Se formó un precipitado y se volvió a disolver mediante adición de DMF (1 ml). Después de 1 hora se añadió una solución de NaCNBH₃ (20 mg, en 0,5 ml de MeCN (230 μl)) por porciones y se dejó en reposo durante 20 hrs. La reacción se inactivó mediante adición de AcOH (2 ml) y se diluyó con agua hasta un volumen total de 20 ml y se purificó en HPLC prep. en una columna C18 con un gradiente de MeCN/ TFA al 0,1 % de 40-80 % contra TFA al 0,1 % en agua. El último pico de elución se recogió, se diluyó de 70 % de MeCN a 10 % con agua y se liofilizó para producir 4,51 mg del compuesto.

15 TOF-MS: masa 23 237,6.

Ejemplo 52

20 Los compuestos de GH como se describen en la presente se analizaron en uno o más de los ensayos descritos en la presente anteriormente.

Los valores de EC₅₀ basados en un ensayo de BAF así como la vida media (T_½) y el tiempo medio de residencia (MRT) se determinaron y se incluyen en la tabla 2 más adelante.

25 La tasa de eliminación para los compuestos seleccionados se midió en cinco cerdos hembra de LYD cruzado como se describió anteriormente. Los resultados se presentan como AUC (0-45 hrs) en la tabla 2. La propiedad que aumenta la solubilidad expresada como cLogP del espacio (B) según se determina por el método descrito anteriormente también se incluye en la tabla 2.

30 La afinidad de unión a la albúmina según se determina por Biacor y o HPLC también se incluye en la tabla 2.

También se incluyen los datos relacionados con un compuesto de hGH pegilado. PEG-hGH es idéntico al compuesto descrito en el ejemplo 1 del documento WO2006024953A2.

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2

Compuesto	Grupo de unión a la albúmina y adhesión	Solubilidad del espaciador (B) ¹⁾ cLogP	EC50/ potencia (BAF)	T _{1/2} (i.v. rata) (horas)	Tiempo medio de residencia (MRT)	Eliminación AUC (0-45 hora)	Afinidad del grupo de unión a la albúmina (Biacor)	Unión a la albúmina (HPLC) (Rt, min)
hGH	-	-	1	0,15	-	519	-	0,36
hGH-PEG	-	-	26	5,8	-	2426	-	-
Ej. 28	Gln141 Ej. 4	-5,32	1,4	1,6	8,3	ND	0,58	7,16
Ej. 29	Gln141 Ej. 5	0,25	1,3	1,5	12,3	1659	0,50	6,76
Ej. 30	Gln141 Ej. 6	-6,79	1,5	2	3,6	2283	0,76	7,00
Ej. 31	Gln141 Ej. 7	-7,05	1,7	ND	ND	1977	0,65	7,46
Ej. 32	Gln141 Ej. 8	-0,44	0,3	ND	ND	1500	ND	4,25
Ej. 33	Gln141 Ej. 9	-2,17	0,63	ND	ND	1789	0,02	6,57
Ej. 34	Gln141 Ej. 10	-0,44	0,62	0,84	ND	903	ND	6,01
Ej. 35	Gln141 Ej. 11	-3,43	0,78	1,6	7,0	ND	0,23	6,75
Ej. 36	Gln141 Ej. 12	-2,43	0,84	1,8	7,4	1606	0,41	6,88
Ej. 37	Gln141 Ej. 13	-5,07	0,64	0,86	1,5	1260	ND	6,45
Ej. 41	Gln141 Ej. 17	-2,74	2,52	2,3	6,2	1570	0,29	7,06
Ej. 42	Gln141 Ej. 18	-4,76	2,10	ND	ND	ND	ND	5,69
Ej. 47	Gln141 Ej. 23	-0,67	ND	ND	ND	ND	ND	7,00
Ej. 50	Gln40 Ej. 6	-6,79	1,60	2,8	4,3	ND	0,55	ND
Ej. 51	N-terminal Ej. 3	-5,87	2,80	2,5	11,6	1935	0,74	7,07

¹⁾ Para el propósito del cálculo * se ha establecido para el carbono en los elementos del espaciador B individual.

Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S
Behrens, Carsten
5 Buchardt, Jens
Nørskov-Lauritsen, Leif
Jing, Su
Andersen, Henrik S
Johansen, Nils L
10
<120> HORMONAS DE CRECIMIENTO CON EFICACIA PROLONGADA IN VIVO

<130> 7928.204-WO

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
20 <211> 191
<212>PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 703 388 T3

5 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
 10 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 15 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60
 20 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 25 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
 85 90 95
 30 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
 100 105 110
 35 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
 115 120 125
 40 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
 130 135 140
 45 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
 50 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de una hormona de crecimiento que tiene la fórmula (I):

5 A-W-B-GH (I)

en donde

GH representa un compuesto de hormona de crecimiento,

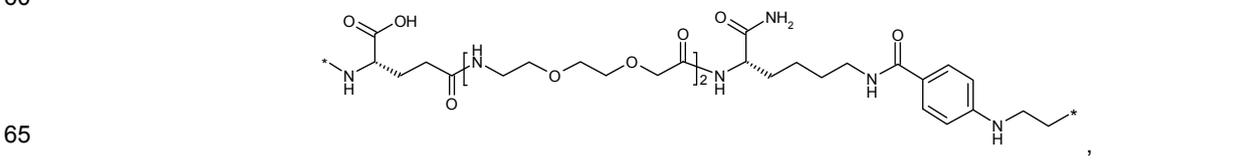
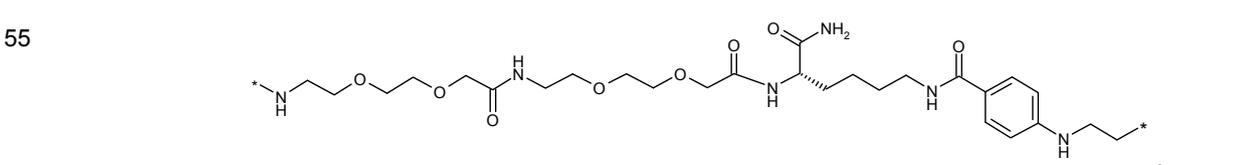
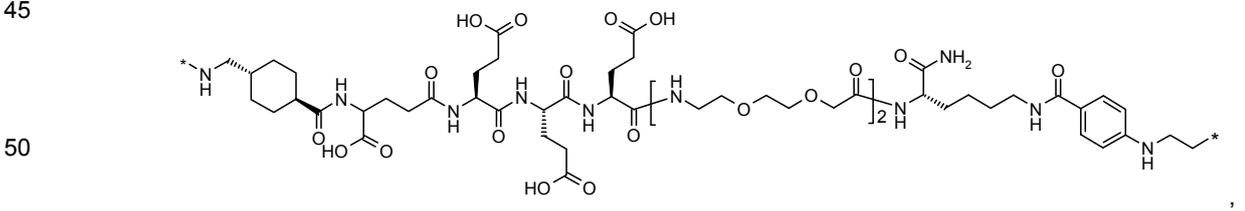
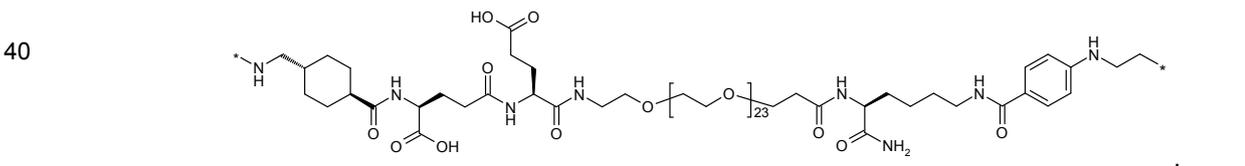
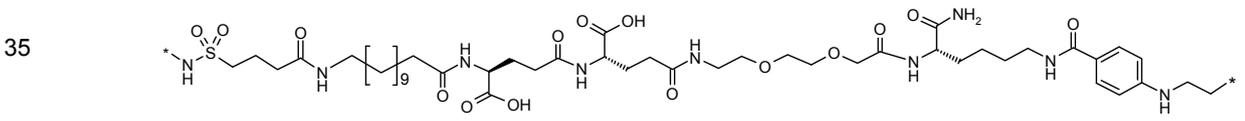
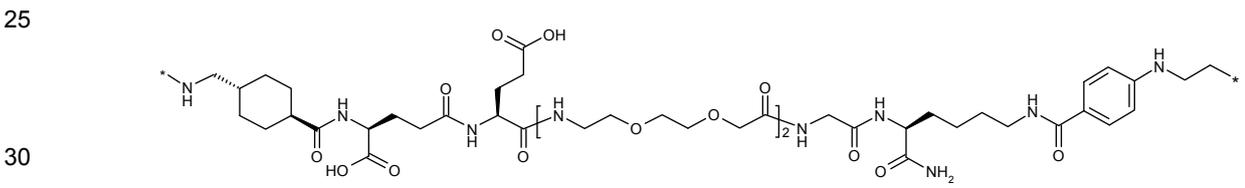
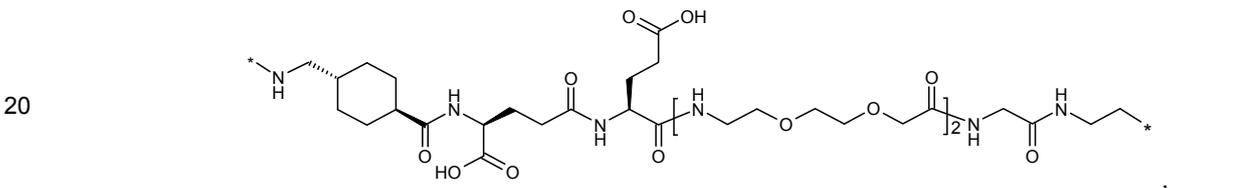
10

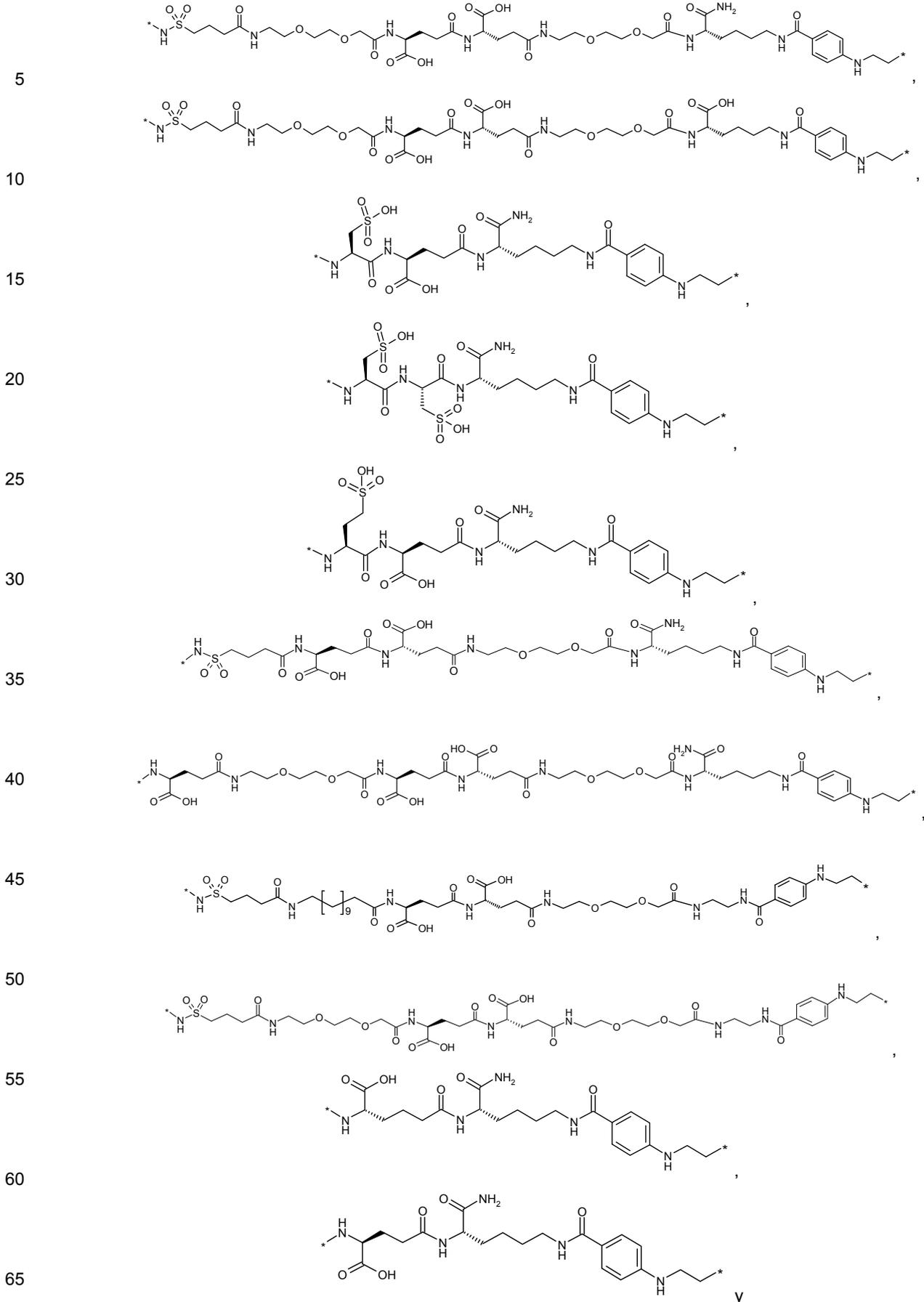
A representa un residuo de unión a la albúmina;

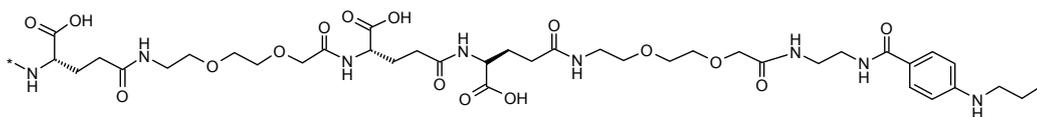
W es un grupo químico que une A y B, y

15

en donde B representa un espaciador hidrofílico seleccionado de:







5

en donde * denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

2. El conjugado de conformidad con la reivindicación 1, en donde W tiene la fórmula

10



en donde

Y es $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8- o un enlace de valencia,

15

17 es 0-6,

W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s3$ es 0 o 1, y

20

W_8 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$,

25

$-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$,

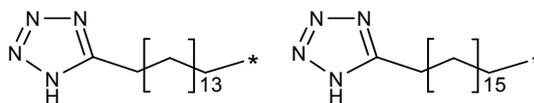
$-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s4$ es 0 o 1.

3. El conjugado de conformidad con la reivindicación 2, en donde W_7 y W_8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ y un enlace de valencia.

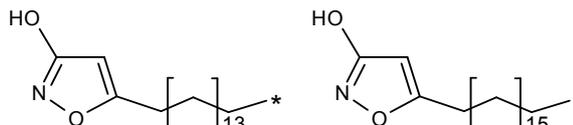
30

4. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde A se selecciona de

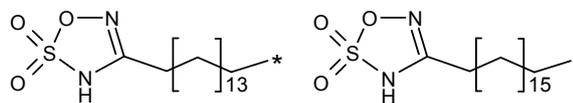
35



40

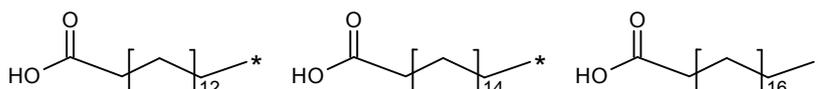


45

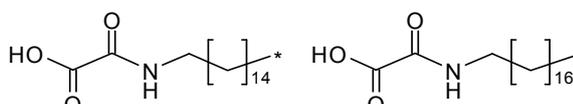


50

55

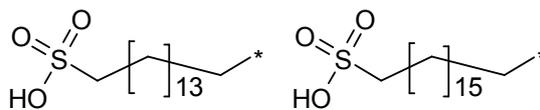


60

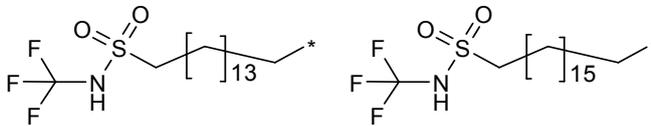


65

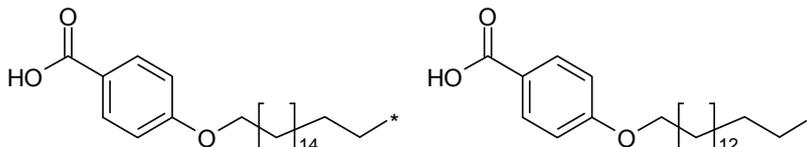
5



10



15



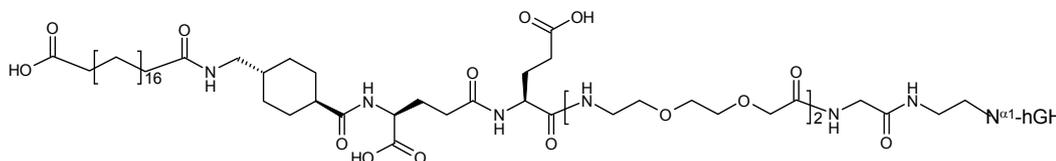
20

en donde * denota la unión a B a W.

25

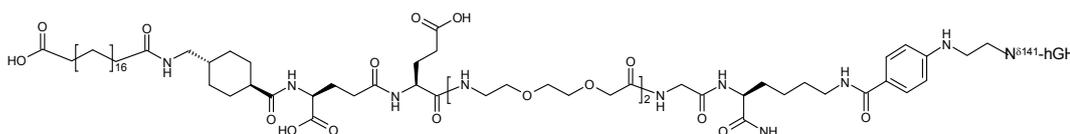
5. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde GH es hGH (sec. con núm. de ident.:1).
6. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde GH es al menos 90 % idéntica a hGH (sec. con núm. de ident.:1).
7. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde GH es al menos 95 % idéntica a hGH (sec. con núm. de ident.:1) y tiene al menos 80 % de la actividad de hormona de crecimiento de la hGH según se determina por el ensayo I.
8. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, B, se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 en la sec. con núm. de ident. 1, el residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 en la sec. con núm. de ident. 1 o el residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento.
9. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, B, se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 en la sec. con núm. de ident. 1.
10. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico, B, se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 141 en la sec. con núm. de ident. 1.
11. El conjugado de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona de:

45



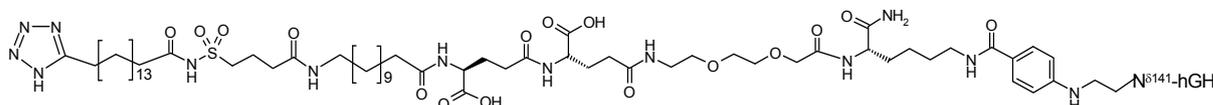
50

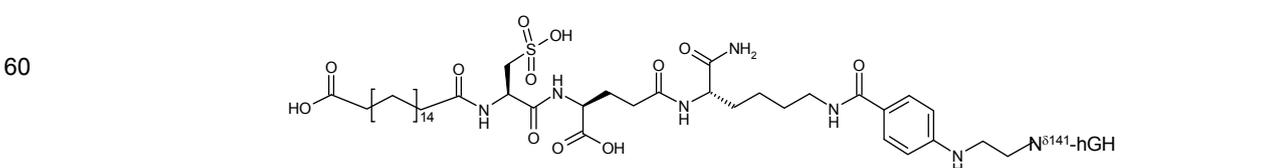
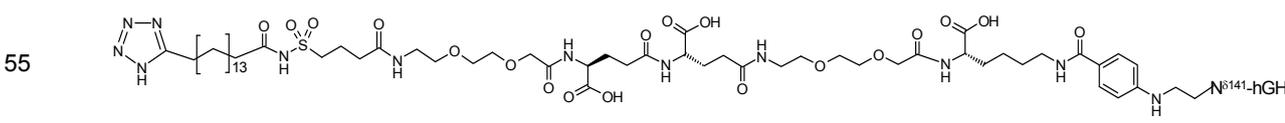
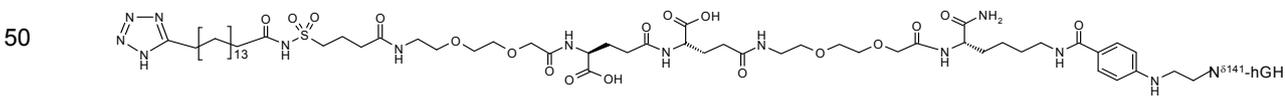
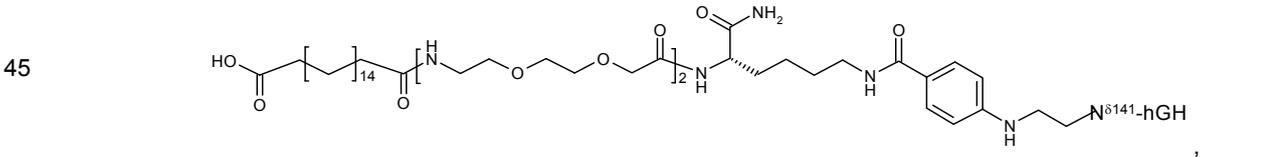
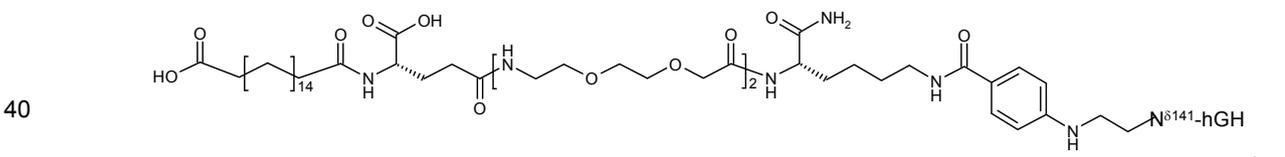
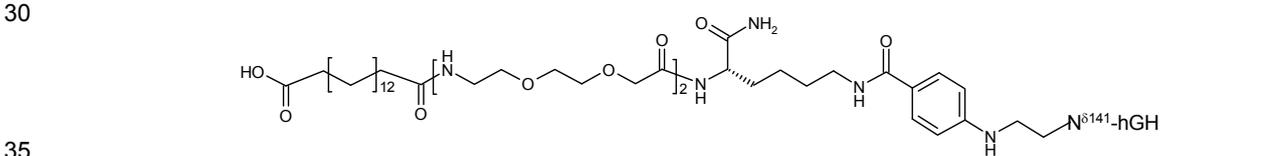
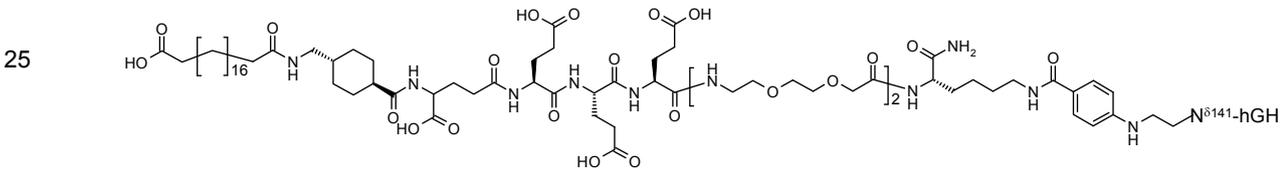
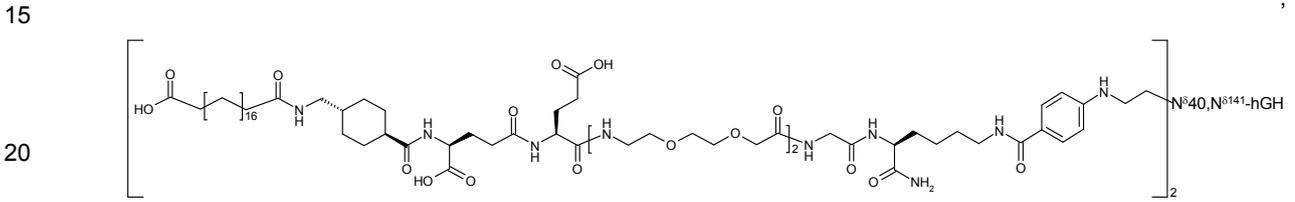
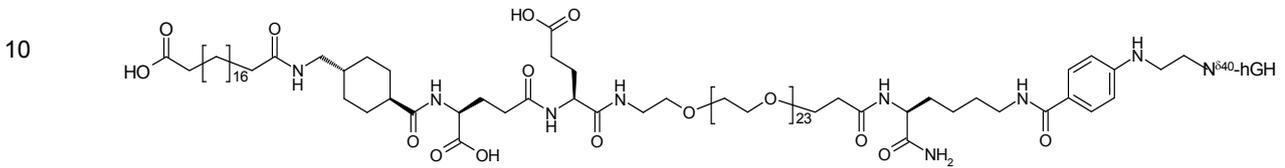
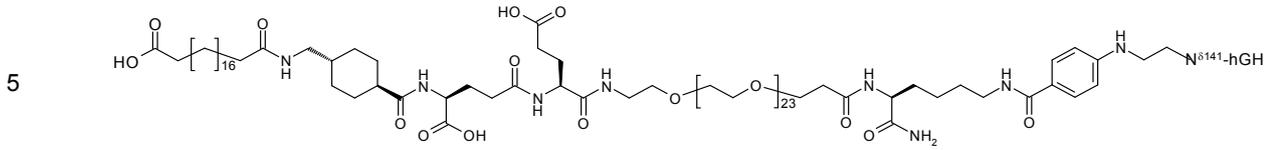
55



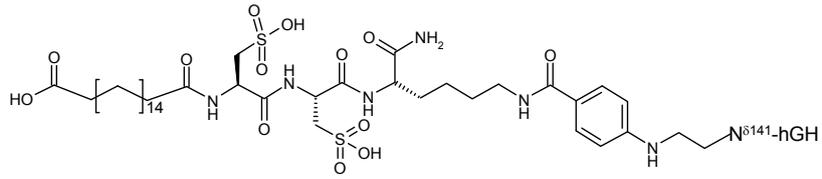
60

65

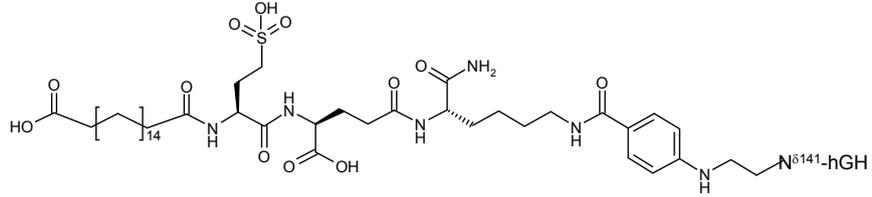




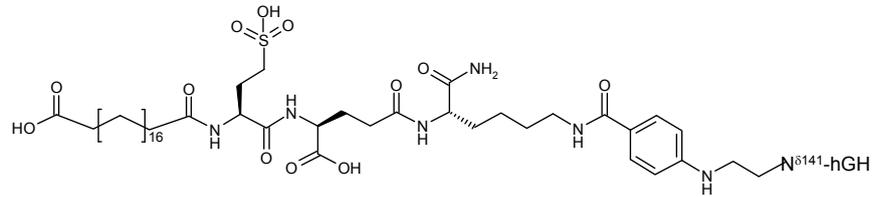
5



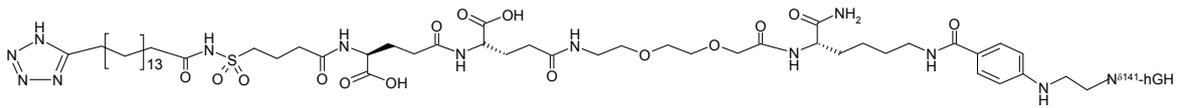
10



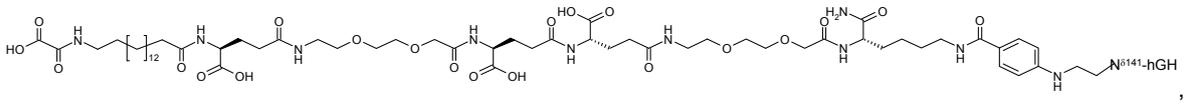
15



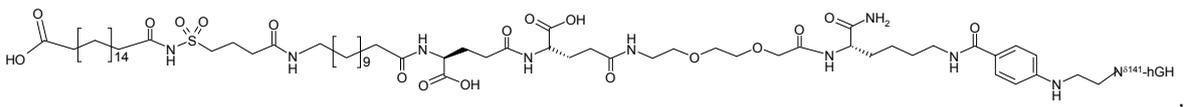
20



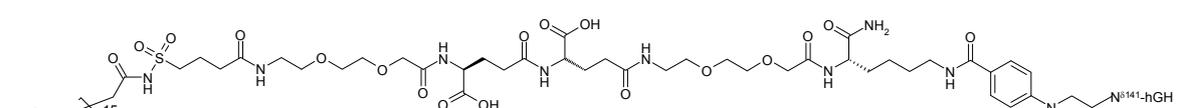
25



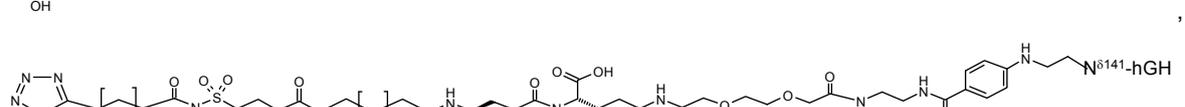
30



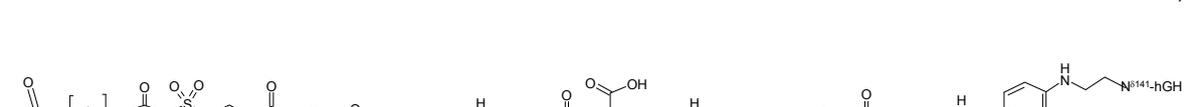
35



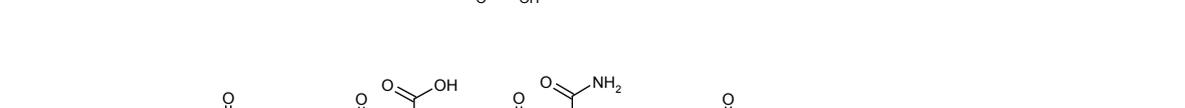
40



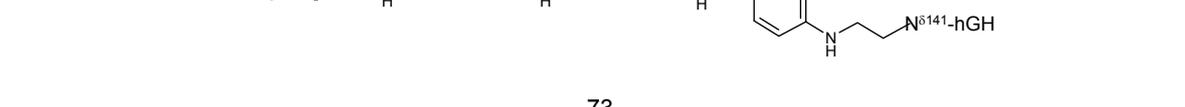
45



50



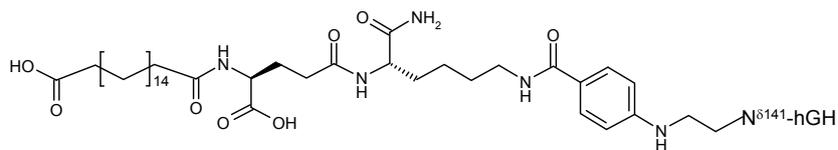
55



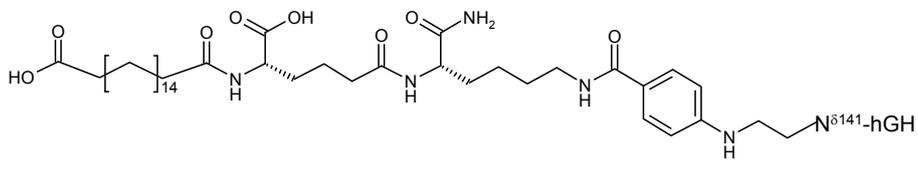
60

65

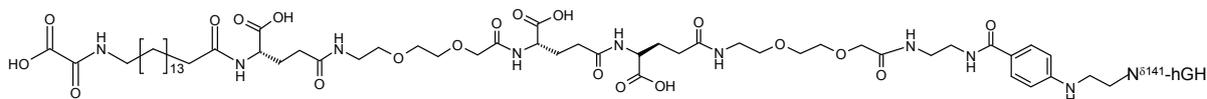
5



10



15



20

12. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.

25

13. Un conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en un método de tratamiento de síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por HIV en niños que reciben tratamiento HAART (niños con HIV/HALS); niños que nacen pequeños para la edad gestacional (SGA); estatura pequeña en niños que nacen con muy bajo peso al nacer (VLBW) excepto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura pequeña idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en o de huesos largos, como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso, y dígitos; fracturas en o de huesos esponjosos, como el cráneo, base de la mano, y base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos en, por ejemplo, mano, rodilla, u hombro; pacientes que tienen o padecen de osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, tal como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material de osteosíntesis, como clavos, tornillos y placas; pacientes sin unión o con una mala unión de fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de tibia o del 1^{er} dedo del pie; pacientes después de implante de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla provocada por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada con estado de mal nutrición en APCD; reversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; HIV en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función hepática afectada; hombres con infecciones por HIV; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a HIV (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/fármacos o trauma neurológico; envejecimiento; ancianidad débil; osteoartritis; cartílago con daño traumático; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; estatura pequeña debido al tratamiento con glucocorticoides en niños, la aceleración de la cicatrización de tejido muscular, tejido nervioso o heridas; la aceleración o mejora del flujo sanguíneo a un tejido dañado; o la disminución de la tasa de infección en tejido dañado.

50

14. El uso de un conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la producción de un medicamento para el tratamiento de síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; enfermedad renal crónica, artritis reumatoide juvenil; fibrosis quística, infección por HIV en niños que reciben tratamiento HAART (niños con HIV/HALS); niños que nacen pequeños para la edad gestacional (SGA); estatura pequeña en niños que nacen con muy bajo peso al nacer (VLBW) excepto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura pequeña idiopática (ISS); GHD en adultos; fracturas en o de huesos largos, como tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, clavícula, metacarpo, metatarso, y dígitos; fracturas en o de huesos esponjosos, como el cráneo, base de la mano, y base del pie; pacientes después de una cirugía de tendones o ligamentos en, por ejemplo, mano, rodilla, u hombro; pacientes que tienen o padecen de osteogénesis por distracción; pacientes después de un reemplazo de cadera o disco, reparación del menisco, fusiones espinales o fijación de prótesis, tal como en la rodilla, cadera, hombro, codo, muñeca o mandíbula; pacientes en los que se ha fijado material de osteosíntesis, como clavos, tornillos y placas; pacientes sin unión o con una mala unión de fracturas; pacientes después de una osteotomía, por ejemplo, de tibia o del 1^{er} dedo del pie; pacientes después de implante de injertos; degeneración del cartílago articular en la rodilla provocada por trauma o artritis; osteoporosis en pacientes con síndrome de Turner; osteoporosis en hombres; pacientes adultos en diálisis crónica (APCD); enfermedad cardiovascular asociada

65

5 con estado de mal nutrición en APCD; reversión de la caquexia en APCD; cáncer en APCD; enfermedad pulmonar obstructiva crónica en APCD; HIV en APCD; ancianos con APCD; enfermedad hepática crónica en APCD, síndrome de fatiga en APCD; enfermedad de Crohn; función hepática afectada; hombres con infecciones por HIV; síndrome del intestino corto; obesidad central; síndrome de lipodistrofia asociado a HIV (HALS); infertilidad masculina; pacientes después de cirugía mayor electiva, desintoxicación de alcohol/fármacos o trauma neurológico; envejecimiento; ancianidad débil; osteoartritis; cartílago con daño traumático; disfunción eréctil; fibromialgia; trastornos de memoria; depresión; lesión cerebral traumática; hemorragia subaracnoidea; muy bajo peso al nacer; síndrome metabólico; miopatía glucocorticoide; estatura pequeña debido al tratamiento con glucocorticoides en niños, la aceleración de la cicatrización de tejido muscular, tejido nervioso o heridas; la aceleración o mejora del flujo sanguíneo a un tejido dañado; o la disminución de la tasa de infección en tejido dañado.

10