

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 484**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2011 PCT/EP2011/050923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11089255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2011 E 11705470 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2525834**

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

30 Prioridad:

22.01.2010 US 297305 P
22.01.2010 EP 10151405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BEHRENS, CARSTEN;
JOHANSEN, NILS LANGELAND;
ANDERSEN, HENRIK SUNE;
NØRSKOV-LAURITSEN, LEIF y
BUCHARDT, JENS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 745 484 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 conjugados de hormona de crecimiento tienen mayor resistencia a la degradación proteolítica en combinación con un perfil de acción prolongado y son útiles en la terapia.

Antecedentes de la invención

La hormona de crecimiento es una hormona polipeptídica secretada por la glándula pituitaria anterior en mamíferos. En dependencia de la especie, la hormona de crecimiento es una proteína compuesta de aproximadamente 190 residuos de aminoácidos que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 22 kDa. La hormona de crecimiento se une a y señala a través de receptores de la superficie celular, los receptores de la hormona de crecimiento (GHR). La hormona de crecimiento desempeña un papel clave en la promoción del crecimiento, manteniendo la composición corporal normal, el anabolismo y el metabolismo de lípidos. También tiene efectos directos sobre el metabolismo de intermedios, tales como la disminución de la captación de glucosa, aumento de la lipólisis, aumento de la captación de aminoácidos y síntesis de proteínas. La hormona también ejerce efectos sobre otros tejidos que incluyen tejido adiposo, hígado, intestino, riñón, esqueleto, tejido conectivo y músculo. La hormona de crecimiento humano recombinante (hGH) se ha producido y está disponible comercialmente como, por ejemplo: Genotropin™ (Farmacia Upjohn), Nutropin™ y Protropin™ (Genentech), Humatrope™ (Eli Lilly), Serostim™ (Serono), Norditropin (Novo Nordisk), Omnitrope (Sandoz), Nutropin Depot (Genentech y Alkermes). Adicionalmente, un análogo con un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal también se comercializa como, por ejemplo: Somatonorm™ (Farmacia Upjohn/Pfizer).

La hormona de crecimiento comparte una topología común con los otros miembros de la familia de hormonas de crecimiento de proteínas, Prolactina (PRL) y Lactógeno Placentario (PL). La hormona de crecimiento se clasifica como una proteína de haz de cuatro hélices (Figura 1) que presenta una topología "arriba-arriba-abajo-abajo" con dos enlaces disulfuro conservados. Específicamente, la hormona de crecimiento humano de tipo silvestre (hGH) se compone de 191 residuos de aminoácidos y tiene cuatro residuos de cisteína en las posiciones 53, 165, 182 y 189, que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína al formar dos enlaces disulfuro intramoleculares que conectan C53 con C165 y C182 con C189, respectivamente (Figura 1). La estructura de hGH se ha determinado experimentalmente por cristalografía de rayos X en forma libre (Chantalet L. y otros *Protein and Peptide Letters* 3, 333-340, (1995)) y en complejo con su proteína de unión (el dominio extracelular del GHR humano (hGHR)) (Devos, A. M. y otros *Science* 255, 306-312, (1992)). Estas estructuras se han depositado en el Banco de Datos de Proteína (PDB) y están disponibles públicamente (códigos de acceso del PDB 1HGU y 1HWG, respectivamente). Por lo tanto, a partir de las estructuras de hGH publicadas, pueden identificarse residuos importantes para la unión de hGH a hGHR. Además, las propiedades dinámicas de hGH se han estudiado por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Kasimova M.R. y otros. *J. Mol. Biol.* 318, 679-695, (2002)). En combinación, los datos de rayos X y NMR pueden distinguir regiones de hGH que están bien estructuradas y bien definidas de regiones que son menos estructuradas y dinámicas. Se espera que las regiones menos estructuradas y dinámicas de hGH sean particularmente susceptibles a la escisión proteolítica y la estabilización adecuada de tales regiones conduciría a una estabilidad proteolítica mejorada.

La hGH se ha sometido a mutagénesis extensa en intentos de producir análogos de hGH con propiedades químicas o biológicas deseadas. Específicamente, se han descrito mutantes de cisteína para varios propósitos.

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

El documento núm. WO 02/055532 describe mutantes hGH genéticamente modificados que tienen al menos un resto no polipeptídico unido covalentemente, particularmente mutantes de hGH donde se usó un residuo de cisteína introducido para la pegilación.

El documento núm. US 5,951,972 describe proteínas y polipéptidos de mamíferos y humanos, naturales y recombinantes, derivados fisiológicamente activos en donde al menos un residuo de cisteína de origen natural o incorporado dentro de la proteína se deriva con varios sustituyentes.

65

- La escisión proteolítica de hGH se ha estudiado en detalle. El bucle largo compuesto por los residuos 128 a 154 tiene sitios de escisión putativos para varias proteasas, tales como trombina, plasmina, colagenasa, subtilisina y serina proteasas similares a quimotripsina. En consecuencia, se ha demostrado que esta parte de hGH es particularmente susceptible a la escisión proteolítica (Lewis, U.J. *Ann. Rev. Fisiol* 46, 33-42, (1984)). Las enzimas reportadas para degradar hGH incluyen trombina, plasmina, subtilisina, serina proteasas similares a quimotripsina y calicreínas.
- La degradación de hGH en el tejido de rata se ha investigado (García-Barros y otros *J. Endocrinol. Invest.* 23, 748-754, (2000)).
- En las glándulas tiroideas de rata, las proteasas similares a quimotripsina, que favorece la escisión en residuos de aminoácidos voluminosos y lipofílicos, se encontró inicialmente que escinden el enlace peptídico entre Y143 y S144 lo que resulta en una molécula de dos cadenas, seguido por la escisión entre Y42 y S43, que libera el péptido N-terminal N1-Y42. El bucle dividido en la molécula de dos cadenas se procesa además por escisión entre F146 y D147 por proteasas similares a quimotripsina y además por la acción de carboxipeptidasas.
- Se han reportado varios métodos para producir análogos de hGH estabilizados hacia la degradación proteolítica.
- Alam y otros *J. Biotech.* 65, 183-190, (1998) diseñaron mutantes de hGH resistentes a la trombina y la plasmina por mutaciones puntuales específicas. La trombina escinde hGH específicamente entre R134 y T135, y el mutante doble R134D, T135P proporcionó una variante de hGH resistente a la escisión por la trombina, y el mutante triple R134D, T135P, K140A resultó en resistencia a la plasmina. Además, el último mutante de hGH fue resistente a la proteólisis por plasma humano durante un período de 7 días.
- El documento núm. EP 534568 describe mutantes de hGH estabilizados hacia la degradación proteolítica mediante la mutación de R134 a alanina, leucina, treonina, fenilalanina, prolina o histidina.
- El documento núm. WO 2004/022593/Nautilus describe métodos generales de evolución dirigida de alto rendimiento para producir citocinas modificadas, que incluyen variantes de GH, con estabilidad proteolítica aumentada.
- El documento núm. WO 2006/048777/Nautilus describe específicamente análogos modificados de hGH con estabilidad proteolítica mejorada. Los análogos contienen de una a cinco mutaciones en las posiciones 1-55, 57, 58, 60-63, 67-87, 89-91, 93, 95-100, 102-128, 131-132, 135-139, 141, 142, 144, 148-182, 184, 185 y 187-191. La introducción de residuos de cisteína puede conducir potencialmente a la formación de dímeros enlazados unidos por disulfuro no deseados y en el documento núm. WO 2006/048777 la sustitución de residuos de aminoácidos por cisteína se excluye específicamente del alcance; en el documento núm. WO 2006/048777 (p. 65) se indica: "El reemplazo de aminoácidos por residuos de cisteína se evita explícitamente dado que este cambio podría conducir potencialmente a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares".
- Existe una necesidad obvia de desarrollar compuestos de hGH que sean resistentes a la degradación proteolítica. Tales compuestos estabilizados deben exhibir estabilidad aumentada hacia la escisión proteolítica mientras retienen las propiedades biológicas deseadas de hGH. Tales moléculas de GH tendrían estabilidad aumentada, aclaramiento más lento y/o vida media prolongada *in vivo*.
- Además, 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. 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.
- Los derivados de halógeno activados y maleimidados representan algunos de los grupos funcionales usados más comunes al incorporar conjugados a grupos sulfhidrilo en los péptidos (G. T. Hermanson en *Bioconjugate Techniques* 2. Ed. 2008, Elsevier).

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 -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.

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
LLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQ TLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHND DALLK
NYGLLYCFRKMDK VETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 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 polipéptido, 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 y farmacocinéticas mejoradas así como también métodos para su producción.

Breve descripción de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los conjugados de la presente invención para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

La invención se refiere a un conjugado de la hormona de crecimiento que tiene la fórmula (I)



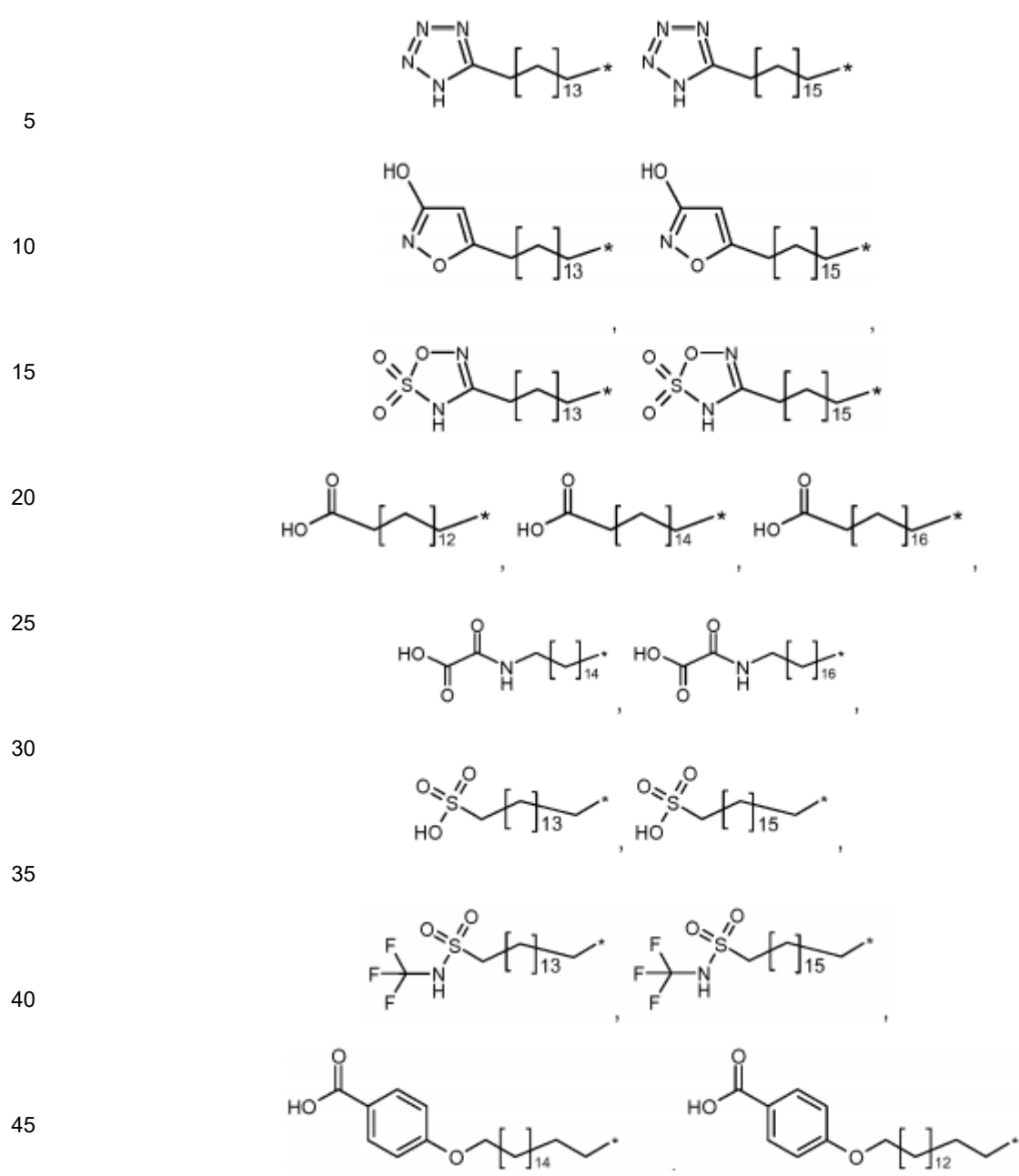
en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento que tiene una única mutación de Cys seleccionada del grupo de mutaciones correspondientes a: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C de hGH (SEQ ID NO: 1),

B representa un espaciador hidrofílico,

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

A representa un residuo de unión a la albúmina seleccionado de:



y

50 en donde * indica la unión a B a través de W, y

en donde el residuo de unión a la albúmina (A) a través del espaciador hidrofílico (B) se une a GH a través del residuo de azufre de la única mutación de Cys, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

55 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 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.

60

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.

65

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 inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que los compuestos de la hormona de crecimiento (GH) con una única mutación de Cys y/o un puente disulfuro adicional pueden unirse selectivamente a un residuo de unión a la albúmina - a través de un espaciador hidrofílico que separa la GH y el residuo de unión a la albúmina, típicamente con un resto químico que tiene $m\text{LogP} < 0$ - o un $c\text{LogP} < 0,5$ para obtener conjugados de GH con propiedades mejoradas, tales como alta potencia *in vitro*, o tal como un aumento de la vida media *in vivo*, o tal como resistencia aumentada a la degradación proteolítica posiblemente en combinación con un perfil de acción prolongado *in vivo*. Al unir un residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico a la única mutación de Cys, la actividad biológica puede conservarse y pueden obtenerse una o más de las mejoras mencionadas anteriormente.

En una modalidad de la presente invención los compuestos de hGH estables tiene(n) enlace(s) disulfuro(s) adicional(es). Los enlaces disulfuro se forman entre pares de cisteínas de las cuales una o ambas se introducen por mutaciones puntuales en la secuencia de hGH de tipo silvestre. El(Los) enlace(s) de disulfuro adicional(es) formado(s) entre los pares de cisteínas adicionales y las cisteínas adicionales se introducen por mutaciones puntuales en la secuencia de hGH de tipo silvestre.

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 se ha conservado una gran proporción de la actividad. El residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se introduce en la(las) posición(ones) correspondiente(s) a la(a las) cisteína(s) introducida(s) en un posición correspondiente a: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C de hGH (SEQ ID NO: 1).

Los conjugados del compuesto de la hormona de crecimiento de la presente invención tienen una absorción subcutánea más rápida en comparación con la hGH PEGilada, y por lo tanto, proporcionan menos o ninguna lipoatrofia. Además, el residuo de unión a la albúmina y el espaciador hidrofílico son biodegradables a diferencia de PEG.

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.

En un objeto adicional de la invención tales compuestos son solubles.

Definiciones

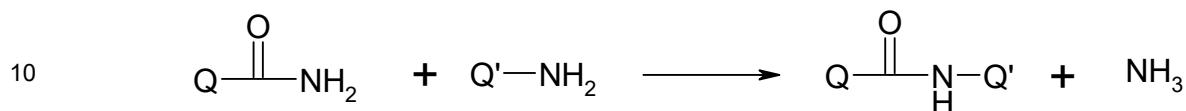
En el presente contexto, el término "compuesto de hormona de crecimiento" como se usa en la presente se refiere a una hormona de crecimiento de origen de mamífero, tal como una hormona de crecimiento humana, bovina o porcina, y una hormona de crecimiento recombinante, tal como una hormona de crecimiento recombinante humana, bovina o porcina, y variantes así como también mutantes 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. Típicamente, la GH tiene al menos 80 % de identidad con hGH, y típicamente, al menos 10 % de la actividad de la hormona de crecimiento de la hGH según se determina en el ensayo (I) (Ejemplo 46) en la presente descripción.

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).

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.

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.

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



- 15 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.

- 20 Ejemplos de transglutaminasas útiles incluyen transglutaminasas microbianas, tal 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 lydicus*) 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).

- 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 desnaturalizantes 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”.

- 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.

- 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, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo y n-hexilo.

El término “C₃₋₁₀ cicloalquilo” típicamente se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, y ciclodecanilo.

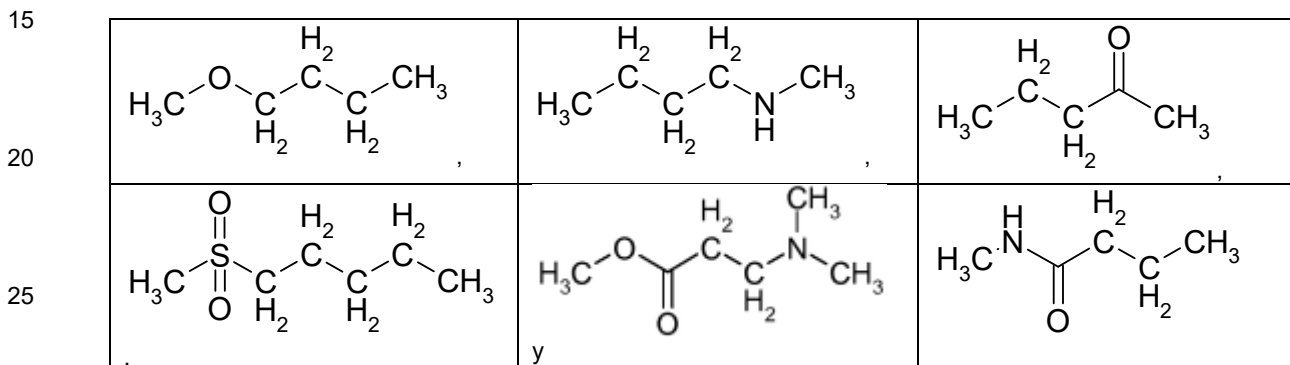
- El término “alqueno” indica hidrocarburos lineales, ramificados y/o cíclicos que comprenden al menos un doble enlace carbono-carbono. A menos que se especifique con otro número de átomos de carbono, se entiende que el término indica hidrocarburos con 2 a 30 (ambos incluidos) átomos de carbono, tal como 2 a 20 (ambos incluidos), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), *por ejemplo* de 2 a 5 (ambos incluidos). Los términos alqueno y alqueno 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), tal como de 2 a 10 (ambos incluidos), *por ejemplo* de 2 a 5 (ambos incluidos). Los términos alquino y alquino 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.

5 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.

10 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.



30 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.

35 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, y similares.

40 Los términos “heteroarilo” o “hetarilo”, como se usan en la presente descripción, 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 y similares.

50 El término “conjugado” como sustantivo se entiende que 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.

55 El término “cys única” o una “cisteína libre” se refiere a un residuo de cisteína, que no está comprometido en un doble enlace. Una proteína, por lo tanto, puede incluir uno o más residuos de cys única además de uno o más puentes disulfuro adicionales, siempre y cuando dichas cys únicas no lleven a uno o más puentes disulfuro internos.

60 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, *terc*-butilo y similares.

65 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 y similares, 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 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.

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 y similares, o b) es biológicamente inactivo pero es convertido 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.

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 aceptables farmacéuticamente, sales metálicas aceptables farmacéuticamente, sales de amonio y de amonio alquiladas. Las sales por adición de ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos así como también de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. 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 y similares. 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 y similares. Los ejemplos de sales de amonio y de amonio alquiladas incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares.

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.

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

La presente invención se refiere a un conjugado de la hormona de crecimiento estable que tiene la fórmula (I):



en donde GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento que tiene una única mutación de Cys seleccionada del grupo de mutaciones correspondientes a: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C de hGH (SEQ ID NO: 1),

A representa un residuo de unión a la albúmina

B representa un espaciador hidrofílico,

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

en donde el residuo de unión a la albúmina (A) a través de un espaciador hidrofílico (B) se une a dicho GH a través del residuo de azufre de la única mutación de Cys, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Se describe que cuando dos o más residuos de unión a la albúmina se unen al compuesto de la hormona de crecimiento a través de un espaciador hidrofílico, entonces tales residuos de unión a la albúmina se unen a una mutación única de Cys si tal mutación está presente o si solo un puente disulfuro adicional está presente, entonces, un residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a una posición en el compuesto de la hormona de crecimiento como se describe en la presente descripción.

En una modalidad, el compuesto de la hormona de crecimiento tiene una única mutación de Cys.

En otra modalidad, el compuesto de la hormona de crecimiento tiene dos mutaciones únicas de Cys.

En una modalidad adicional, el compuesto de la hormona de crecimiento tiene una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional.

En una modalidad adicional GH representa un compuesto de la 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) (SEQ ID NO:1). En modalidades adicionales, GH tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 95 % de identidad con hGH, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 % o tal como al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. En modalidades adicionales, dichas identidades con hGH se asocian con al menos 10 %, tal como 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. Como se describe en la presente descripción, HG puede expresarse como MethG lo cual indica que la secuencia comprende una metionina N-terminal adicional.

En una modalidad, GH es una variante de la hormona de crecimiento en donde se introduce una mutación única de Cys. En modalidades adicionales, GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento que contiene de una a cinco mutaciones además de una mutación única de Cys.

En una modalidad adicional, el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se enlaza a la mutación única de Cys. En una modalidad la mutación única de Cys se ubica en el N-terminal, H1, H2, L2 o H3 de GH. En modalidades adicionales, la mutación única de Cys se ubica en el N-terminal, la mutación es tal como cualquiera de T3C, P5C, S7C, o en H1 (correspondiente a AA 9-35), la mutación es tal como cualquiera de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, o en L1 (correspondiente a AA36-71), la mutación es tal como cualquiera de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C o preferentemente cualquiera de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C o en H2, L2 o H3 (correspondiente a AA 72-98, AA 99-106 y AA 107-127), la mutación es tal como cualquiera de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) o en L3 o H4 (correspondiente a AA128-154 y AA155-184) en L3 y H4 (128-154 y AA155-184) la mutación es tal como cualquiera de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C o en el C-terminal la mutación es tal como cualquiera de E186C G187C G190C.

Si la mutación única de Cys está presente en una variante de hGH la mutación se ubica en los residuos de aminoácidos correspondientes.

En una modalidad particular la mutación única de Cys de GH se ha introducido en una posición equivalente a un GH parental que es equivalente a una posición de hGH (SEQ ID NO: 1) seleccionada del grupo que consiste en: TT3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, K38, E39, Y42, S43, D47, P48, S55, S57, P59, S62, E65, Q69, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122, G126, E129, D130, G131, P133, T135, G136, T142, D147, N149, D154, A155, L156, R178, E186, G187 y G190, tales tal como el grupo que consiste en: T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 y G126 el conjugado de GH comprende además un resto de unión a la albúmina en la cadena lateral de dicho residuo de cisteína único.

En modalidades adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de AA 93-106 en hGH o en los residuos correspondientes en las variantes de hGH. En modalidades específicas adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 o AA 99-103 o en los residuos correspondientes.

5 Cuando una mutación única de Cys está presente en el conjugado del compuesto de la hormona de crecimiento de la presente invención, una mutación única de Cys típica es E30C. Una mutación única de Cys típica adicional es Y42C. Una mutación única de Cys típica adicional es S55C. Una mutación única de Cys típica adicional es S57C. Una mutación única de Cys típica adicional es S62C. Una mutación única de Cys típica adicional es Q69C. Una mutación única de Cys típica adicional es S95C. Una mutación única de Cys típica adicional es A98C. Una mutación única de Cys típica adicional es N99C. Una mutación única de Cys típica adicional es S100C. Una mutación única de Cys típica adicional es L101C. Una mutación única de Cys típica adicional es V102C. Una mutación única de Cys típica adicional es S108C.

10 De acuerdo con la estructura de cristal del complejo rhGH/receptor (PDB: 3HHR) el haz consiste en cuatro hélices principales: primera hélice (A) del residuo 9 al 34, segunda hélice (B) del residuo 72 al 92 y del residuo 94 al 100, tercera hélice (C) del residuo 106 al 128, y cuarta hélice (D) del residuo 155 al 184 (M. R. Kasimova et. ál. *J. Mol. Biol.* 318, 679–695, (2002)). Las cuatro hélices principales se denominan como el núcleo de la proteína. Los residuos que no son parte de las regiones helicoidales se definen como residuos del bucle, y pueden ser parte de regiones flexibles, bucles, giros β , horquillas y espiral. Una localización ligeramente diferente de la hélice se obtiene cuando hGH está en complejo con su proteína de unión (PDB: 1HWG), que es la definición de hélice referida anteriormente.

15 Además, la invención se refiere a un conjugado de GH que comprende al menos un residuo de cisteína introducido cuyo residuo se ha introducido en una posición equivalente a una posición en una región de hélice o bucle de hGH. En particular, los residuos de aminoácidos pueden introducirse en una posición de la superficie expuesta en una región de hélice o bucle que tiene más del 25 % de su cadena lateral expuesta en la superficie, preferentemente más del 50 % de su cadena lateral expuesta en la superficie, por ejemplo, en una estructura modelo de hGH sola o en una estructura modelo de hGH en complejo con sus dos moléculas receptoras. En una modalidad preferida, la posición en la hélice o el bucle es equivalente a una posición fuera de un sitio de unión del receptor de hGH. Los residuos expuestos de la superficie pueden identificarse mediante el uso de algoritmos químicos computacionales. Por ejemplo, las accesibilidades relativas a la superficie pueden calcularse con el programa informático Quanta 2005 de Accelrys Inc. mediante el uso de las coordenadas atómicas de las estructuras públicamente disponibles (códigos de acceso de la PDB 1HGU y estructura 1HWG) y la configuración de parámetros predeterminados. Una descripción del principio subyacente detrás del algoritmo puede encontrarse en B. Lee y F.M. Richards, "The Interpretation of Protein Structure: Estimation of Static Accessibility" *J. Mol. Biol.* 55, 379-400, (1971).

20 En una modalidad adicional, el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une al GH que tiene un puente disulfuro adicional.

25 En una modalidad adicional, la GH comprende enlaces disulfuro adicionales entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos de bucle o entre segmentos helicoidales.

30 En una modalidad adicional, la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

35 En una modalidad adicional, la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle con un segmento helicoidal.

40 En una modalidad adicional, la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle con la hélice B o hélice 2 (correspondiente a AA 72-98).

45 En una modalidad adicional la GH comprende y un enlace de disulfuro adicional que une la hélice 2 (correspondiente a AA 72-98) con el bucle 3 (correspondiente a AA 128-154).

50 En una modalidad adicional, la GH comprende un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en la SEQ ID NO: 1.

55 En una modalidad adicional, el puente disulfuro de GH está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H18C/Y143C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1).

60 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C,

ES 2 745 484 T3

F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

5 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

10 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1.

15 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1. Típicamente, el puente disulfuro adicional es Q84C/Y143C.

20 En una modalidad adicional, el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a la GH que tiene una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional. Típicamente, el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a la mutación única de Cys. En una modalidad particular, la GH tiene un puente disulfuro adicional Q84C/Y143C y una mutación única de Cys L101C donde se une el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico.

25 En modalidades adicionales, la GH tiene un enlace disulfuro adicional y una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C, tal como cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO:1) o los residuos correspondientes en una variante de hGH.

30 En una modalidad particular la GH tiene un enlace disulfuro adicional y una mutación única de Cys, y dicha mutación única de Cys se ha introducido en una posición equivalente a un GH parental que es equivalente a una posición de hGH (SEQ ID NO: 1) seleccionada del grupo que consiste en: T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, K38, E39, Y42, S43, D47, P48, S55, S57, P59, S62, E65, Q69, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122, G126, E129, D130, G131, P133, T135, G136, T142, D147, N149, D154, A155, L156, R178, E186, G187 y G190, preferentemente el grupo; T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 y G126. El conjugado de GH comprende además un resto de unión a la albúmina en la cadena lateral de dicho residuo de cisteína único.

40 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y enlaces disulfuro adicionales entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre los segmentos helicoidales.

45 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

50 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, tal como los residuos de aminoácidos 128-154, con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o hélice 2 (correspondiente a AA 72-98).

En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional que une la hélice 2 (correspondiente a AA 72-98) con el bucle 3 (correspondiente a AA 128-154).

55 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en la SEQ ID NO: 1.

60 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un puente disulfuro adicional entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H18C/Y143C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C,

L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1).

5 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

10 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

15 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1.

20 En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1.

25 La solubilidad de un espaciador hidrofílico (B) puede describirse mediante su valor de logP. LogP, 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 LogP 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 mientras que PGDP solo puede aceptarlos. Los valores de LogP pueden medirse mediante métodos estándar conocidos en la técnica.

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

35 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).

40 Alternativamente, el valor de LogP puede calcularse como mLogP y/o cLogP para la parte unidora de albúmina o la parte del espaciador hidrofílico mediante el uso de algoritmos publicados (T. Fujita; J. Iwasa y C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant, Pi, Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski y otros *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25, (1997) "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. Pharm. Bull.* 42, 976-978, (1994) "Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods").

45 En una modalidad de la presente invención el espaciador hidrofílico (B) tiene un valor de mLogP < 0.

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).

50 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) acoplado a una cisteína libre en el compuesto de hormona de crecimiento (GH).

55 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). Por lo tanto, en un ejemplo un residuo de unión a la albúmina se une por medio de un espaciador hidrofílico (B) a la mutación única de Cys y el otro residuo de unión a la albúmina se une por medio de un espaciador hidrofílico (B) a la glutamina en la posición 40 o la posición 141; o alternativamente dos residuos de unión a la albúmina se unen por medio de un espaciador hidrofílico (B) a la mutación única de Cys o a la glutamina en la posición 40, posición 141 o el 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.

60 En una modalidad el espaciador hidrofílico comprende al menos un motivo OEG, el radical de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctánico, es decir -NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-. En otra modalidad específica el espaciador hidrofílico comprende al menos dos motivos OEG. La orientación del (de los) motivo(s) OEG de este tipo en una modalidad es de manera que -C(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 -NH- está más cerca al residuo de unión a la albúmina. En modalidades adicionales que comprenden dos motivos OEG los dos motivos tienen una orientación idéntica o una

65

orientación diferente. En una modalidad dos de tales motivos OEG se ubican adyacentes entre sí mientras que en modalidades alternativas tales motivos OEG están separados por uno o más átomos unidos covalentemente.

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-carboxi de un segundo Glu puede referirse como un motivo "gamma-Glu".

En una modalidad el espaciador hidrofílico comprende al menos un motivo OEG-Glu combinado (-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)-) o al menos un motivo Glu-OEG combinado (-NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-) o una combinación de estos, en donde tales motivos 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.

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) (SEQ ID NO:1). En modalidades adicionales, GH tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 % o tal como al menos 99 % de identidad con hGH (SEQ ID NO: 1). En modalidades adicionales, dichas identidades con hGH se acoplan con al menos 10 %, tal como 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.

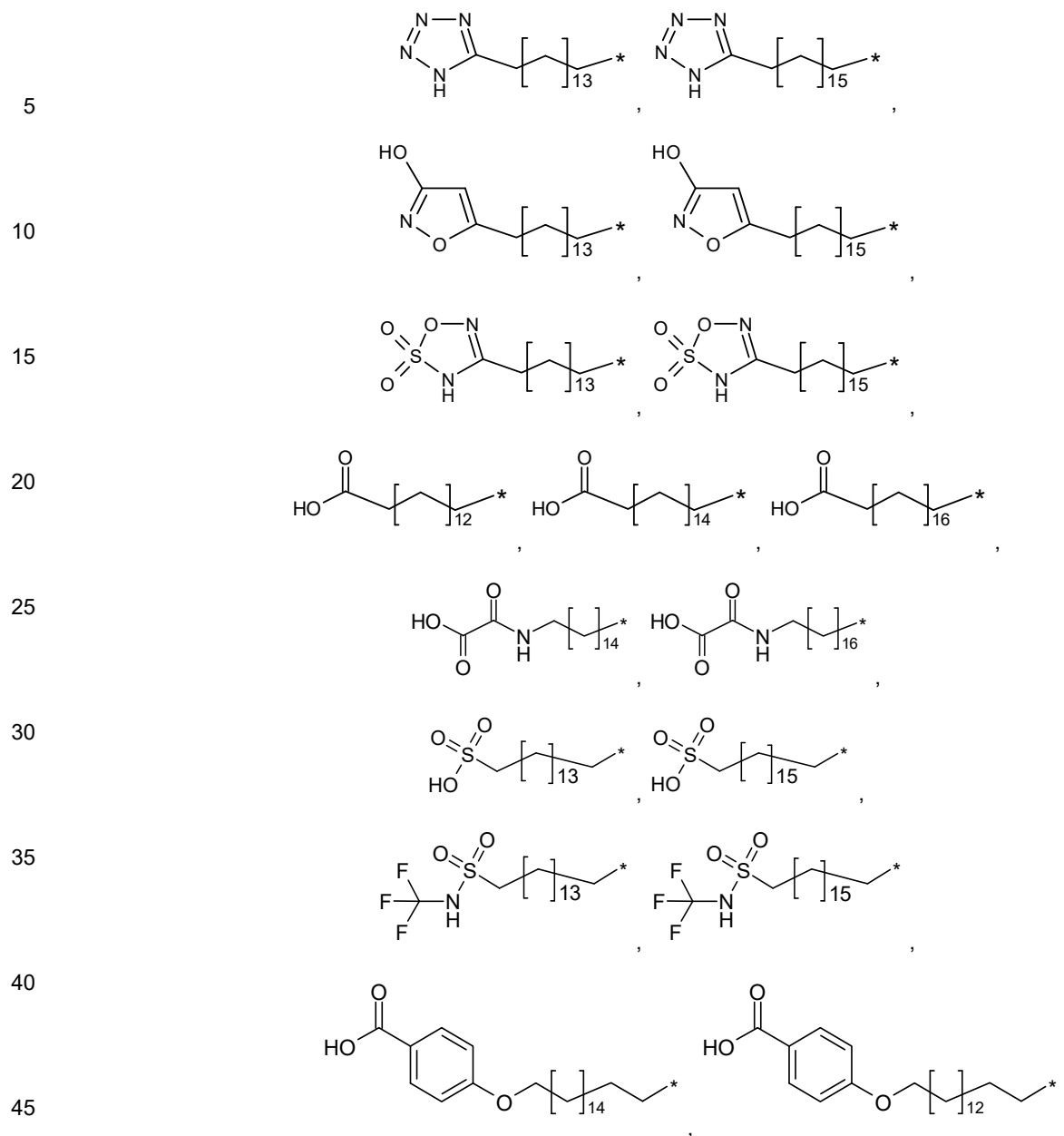
En modalidades adicionales, la GH del conjugado tiene una mutación única de Cys que se selecciona de cualquiera de una mutación única de Cys en las regiones N-terminal, H1, H2L2 o H3 de GH. En tales modalidades adicionales, la mutación única de Cys se ubica en el N-terminal, la mutación es tal como cualquiera de T3C, P5C, S7C, o en H1 (correspondiente a AA 9-35), la mutación es tal como cualquiera de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, o en L1 (correspondiente a AA36-71), la mutación es tal como cualquiera de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C o preferentemente cualquiera de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C o en H2, L2 o H3 (correspondiente a AA 72-98, AA 99-106 y AA 107-127), la mutación es tal como cualquiera de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) o en L3 o H4 (correspondiente a AA128-154 y AA155-184) en L3 y H4 (128-154 y AA155-184) la mutación es tal como cualquiera de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C o en el C-terminal la mutación es tal como cualquiera de E186C G187C G190.

Si la mutación única de Cys está presente en una variante de hGH la mutación se ubica en los residuos de aminoácidos correspondientes.

Las modalidades adicionales incluyen conjugados de GH en donde la mutación única de cys en GH se selecciona de cualquiera de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C, tal como cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO:1).

En incluso modalidades adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de AA 93-106 en hGH o en los residuos correspondientes en las variantes de hGH. En modalidades específicas adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 o AA 99-103 o en los residuos correspondientes.

El residuo de unión a la albúmina (A) se selecciona de



en donde * indica la unión a B a través de W.

50 En una modalidad adicional W tiene la fórmula



en donde

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

17 es 0-6,

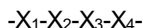
60 W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s_3 es 0 o 1,

65 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 s_4 es 0 o 1.

En modalidades adicionales B comprenden o consiste en uno o más de motivos OEG, y/o gamma-Glu, como se describió anteriormente.

Aún en otra modalidad B tiene la fórmula

5



en donde

10 X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l_1}-W_2]_{m_1}-\{[(CH_2)_{n_1}E1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}-$

X2 es $-[(CHR^3)_{l_3}-W_4]_{m_4}-\{[(CH_2)_{n_3}E2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}-$

15

X3 es $-[(CHR^5)_{l_5}-W_6]_{m_7}-$

X4 es $F-D1-(CH_2)_{l_6}-D2-$

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

20 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,

25

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,

30

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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

35

D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R6)-, -N(C(O)R7)- o un enlace de valencia; en donde R6 y R7 representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W₁ a W₅ 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,

40

W₆ se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde s1 es 0 o 1 y el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

45

En una modalidad adicional l1, l2, l3, l4, l5 e l6 son independientemente 0-6.

En una modalidad adicional m1, m3, m4, m6 y m7 son independientemente 0-6.

50

En una modalidad adicional m2 y m5 son independientemente 0-10.

En una modalidad adicional n1, n2, n3 y n4 son independientemente 0-10.

En una modalidad adicional D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R)⁶- o un enlace de valencia.

55

En una modalidad adicional E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R)⁶- o un enlace de valencia.

60

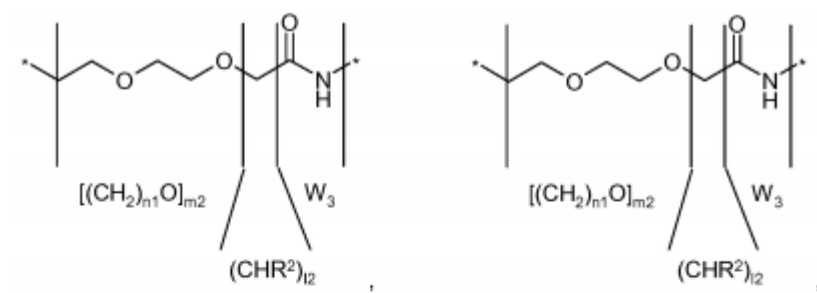
En una modalidad adicional W₁ a través de W₈ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

65

En otra modalidad R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH.

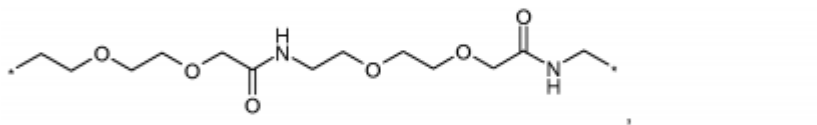
En una modalidad adicional $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}n_2-$ y $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}n_4-$, en donde E1 y E2 son -O-, se seleccionan de

5

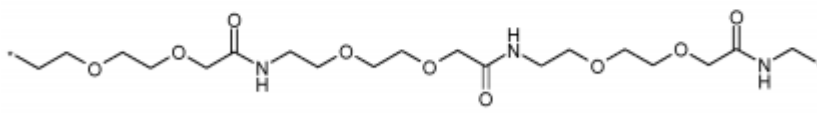


10

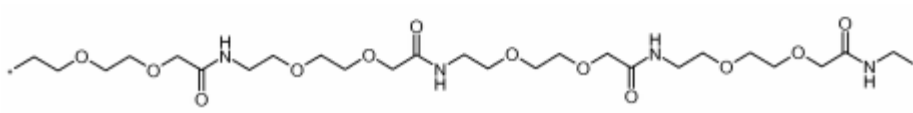
15



20



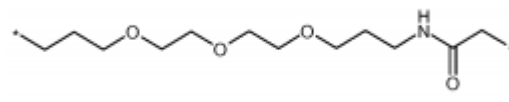
25



30

y

35



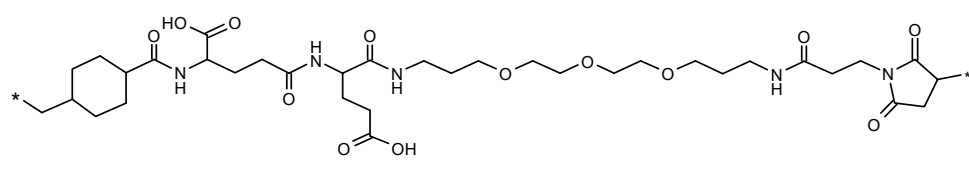
en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

40

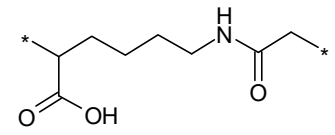
En una modalidad adicional X4 es un enlace de valencia y W6 se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH2COOH o -NHC(O)CH2CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

En una modalidad adicional B se selecciona de

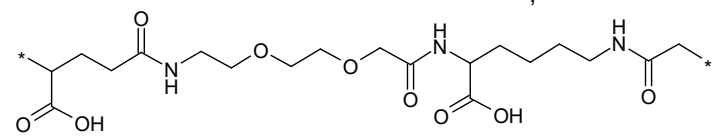
45



50



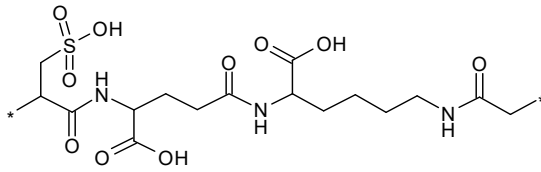
55



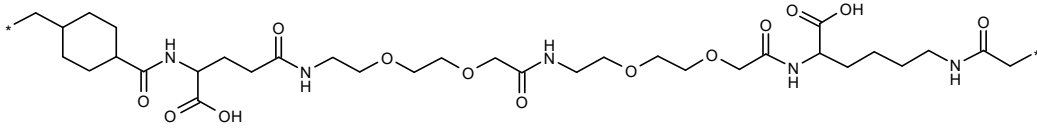
60

65

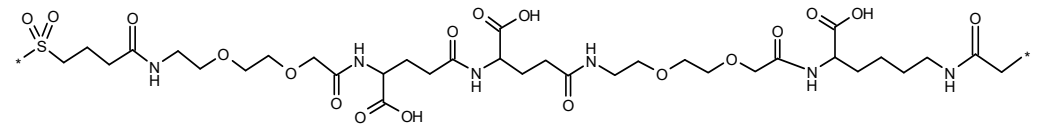
5



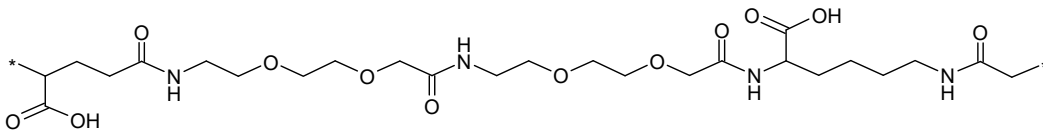
10



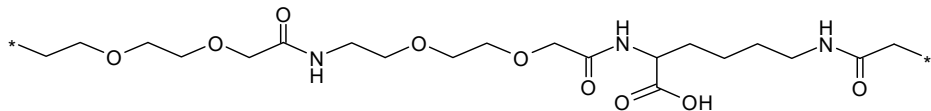
15



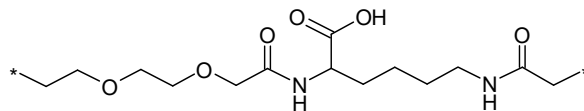
20



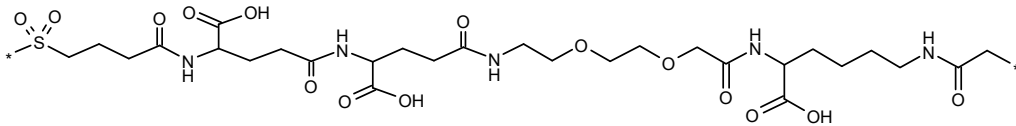
25



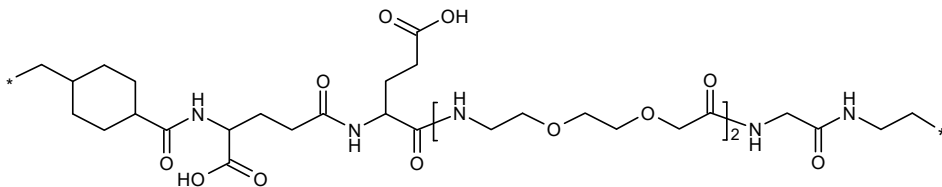
30



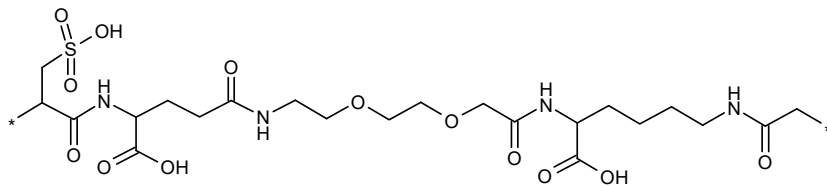
35



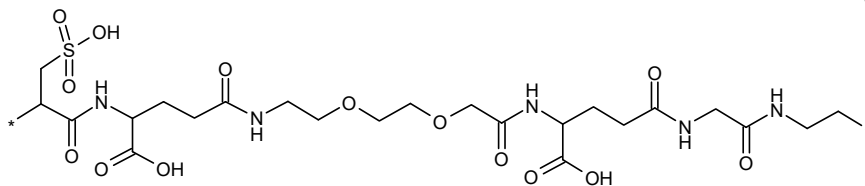
40



45



50



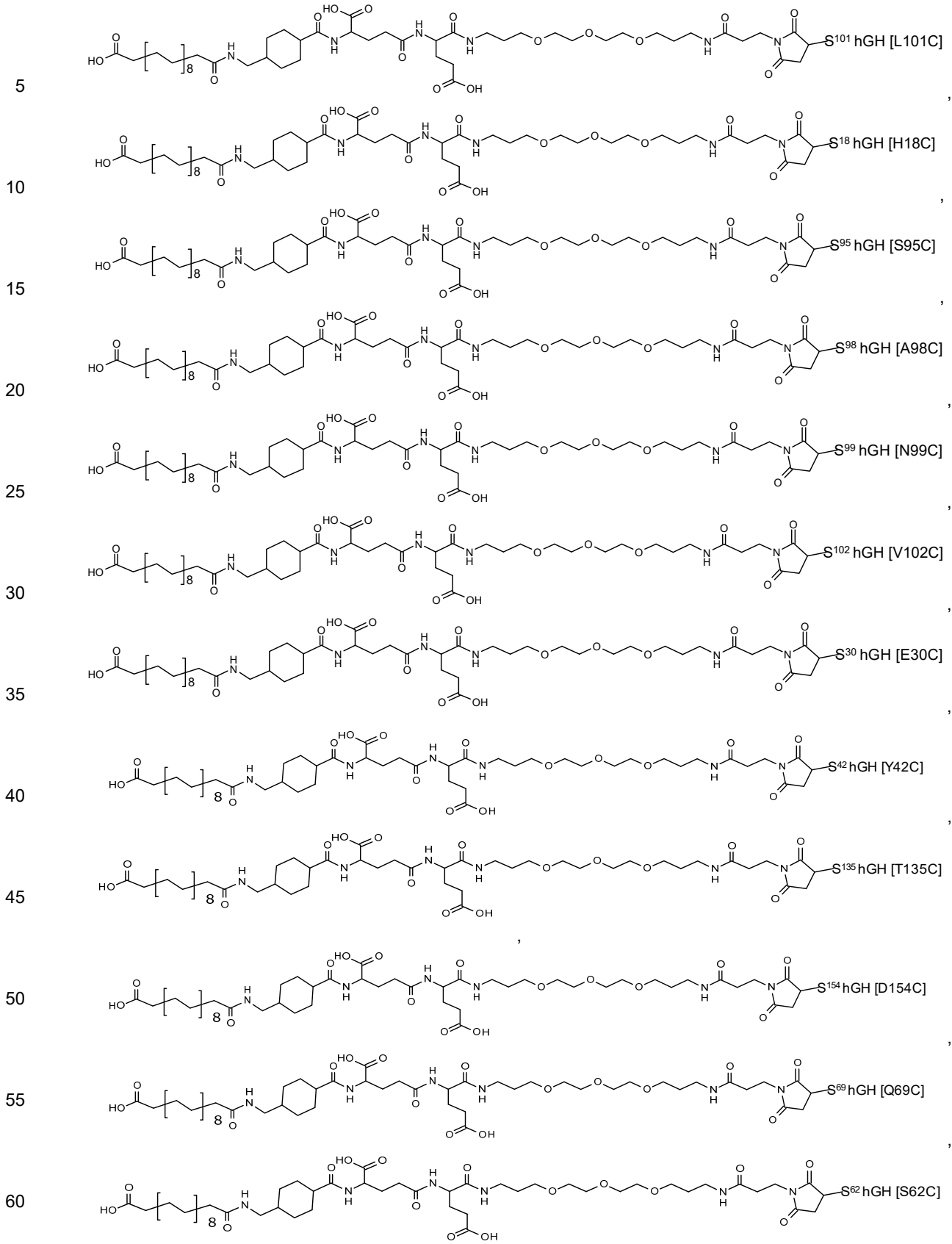
55

60

En una modalidad adicional el conjugado de GH se selecciona de

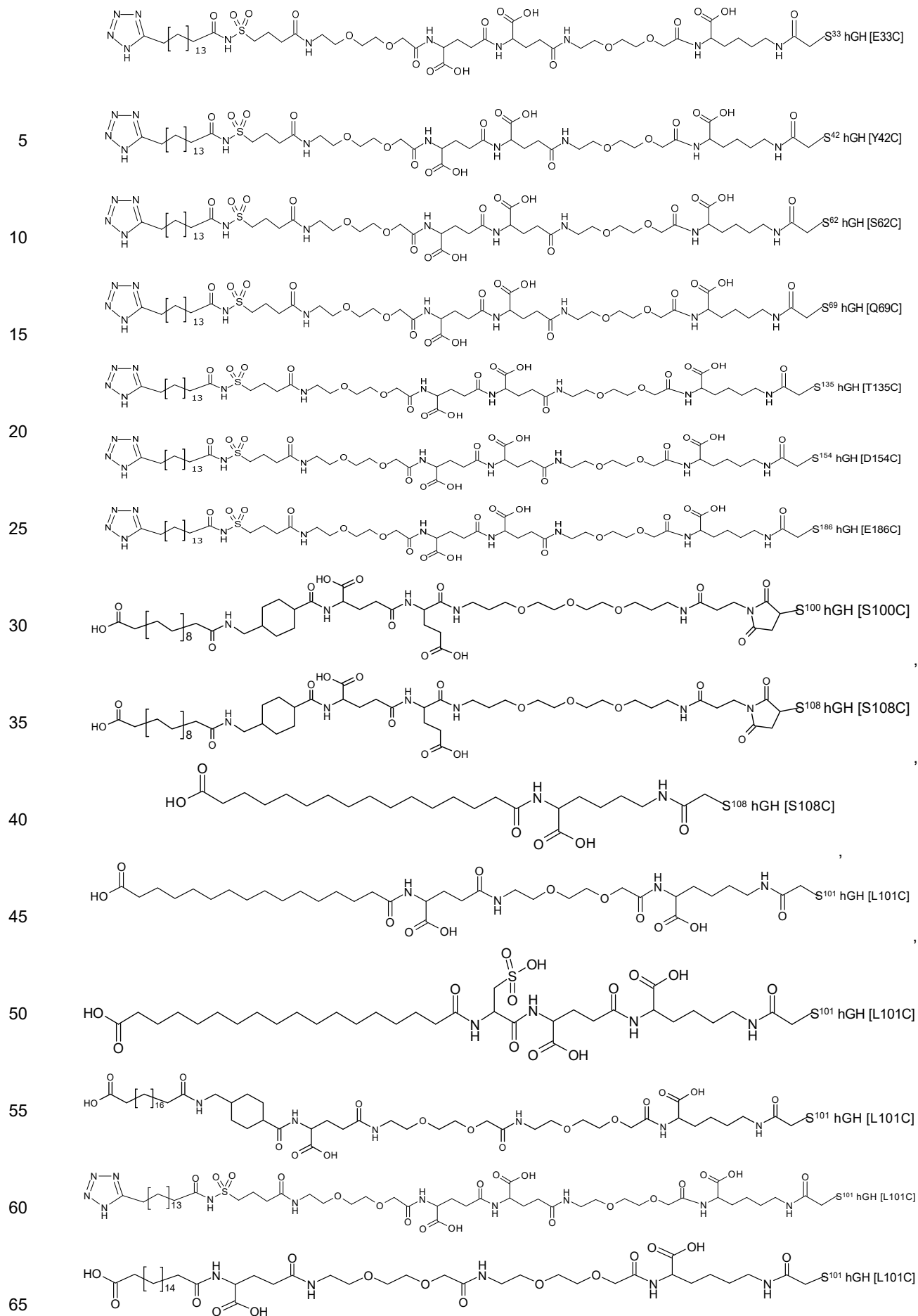
65

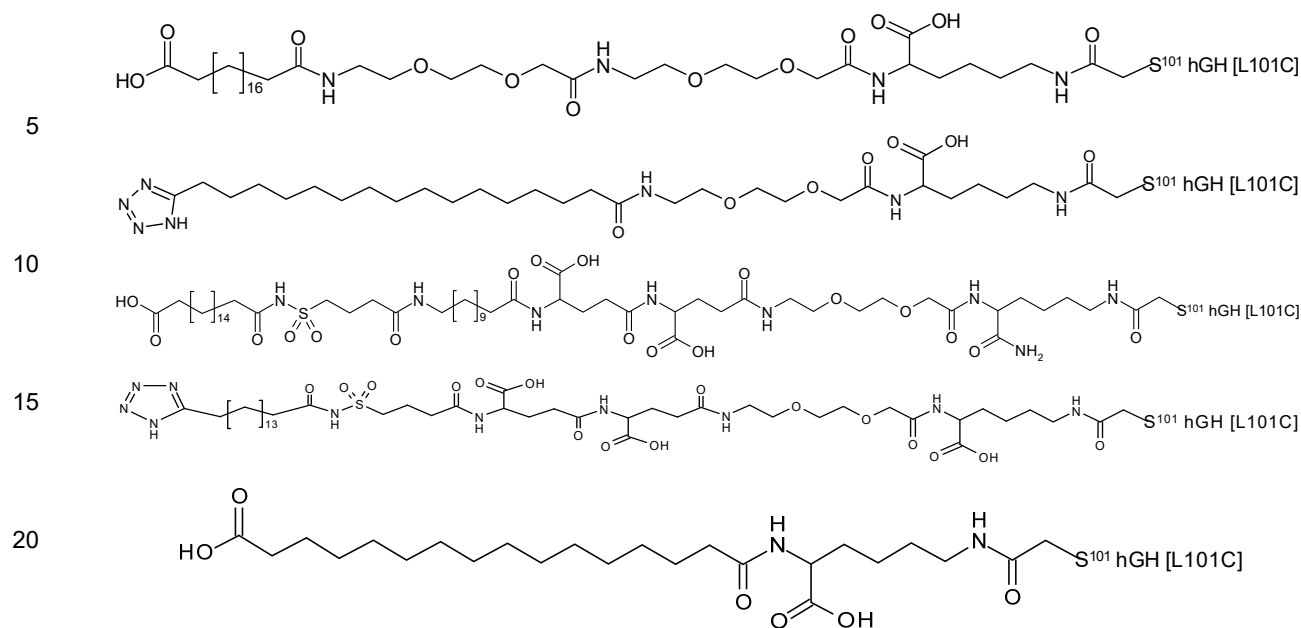
ES 2 745 484 T3



65

ES 2 745 484 T3





En una modalidad, el conjugado de la hormona de crecimiento tiene la fórmula (I):



30 en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional,

35 B representa un espaciador hidrofílico,

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

A representa un residuo de unión a la albúmina

40 en donde el residuo de unión a la albúmina (A) a través del espaciador hidrofílico (B) se une a GH a través del residuo de azufre de la mutación única de Cys, o una sal farmacéuticamente aceptable de este o sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 En una modalidad adicional GH representa un compuesto de la 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) (SEQ ID NO:1). En modalidades adicionales, GH tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 % o tal como al menos 99 % de identidad con hGH (SEQ ID NO: 1). En modalidades adicionales, dichas identidades con hGH se acoplan con al menos 10 %, tal como 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.

55 En modalidades adicionales la GH del conjugado tiene un enlace disulfuro adicional con una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de una mutación única de Cys en las regiones N-terminal, H1, H2L2 o H3 de GH. En tales modalidades adicionales, la mutación única de Cys se ubica en el N-terminal, la mutación es tal como cualquiera de T3C, P5C, S7C, o en H1 (correspondiente a AA 9-35), la mutación es tal como cualquiera de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, o en L1 (correspondiente a AA36-71), la mutación es tal como cualquiera de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C o preferentemente cualquiera de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C o en H2, L2 o H3 (correspondiente a AA 72-98, AA 99-106 y AA 107-127), la mutación es tal como cualquiera de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO: 1), o en L3 o H4 (correspondiente a AA128-154 y AA155-184) en L3 y H4 (128-154 y

ES 2 745 484 T3

AA155-184) la mutación es tal como cualquiera de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C o en el C-terminal la mutación es tal como cualquiera de E186C G187C G190C.

5 Si la mutación única de Cys está presente en una variante de hGH la mutación se ubica en los residuos de aminoácidos correspondientes.

10 Las modalidades adicionales incluye conjugados de GH que tienen un enlace disulfuro adicional y una mutación única de cys en GH se selecciona de cualquiera de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C, tal como cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO:1).

15 En incluso modalidades adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de AA 93-106 en hGH o en los residuos correspondientes en las variantes de hGH. En modalidades específicas adicionales la mutación única de Cys se ubica dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 o AA 99-103 o en los residuos correspondientes.

20 En otra modalidad, el enlace disulfuro adicional puede ser un enlace disulfuro adicional entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre segmentos helicoidales.

25 En una modalidad adicional, la GH comprende un mutante único de cys y un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

30 En una modalidad adicional, la GH comprende un mutante único de cys y un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, tal como los residuos de aminoácidos 128-154, con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o hélice 2 (correspondiente a AA 72-98).

35 En una modalidad adicional, la GH del conjugado comprende un mutante única de cys y un enlace disulfuro adicional que une la hélice 2 (correspondiente a AA 72-98) con el bucle 3 (correspondiente a AA 128-154).

40 En una modalidad adicional, la GH del conjugado comprende un mutante único de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en la SEQ ID NO: 1.

45 En una modalidad adicional, el puente disulfuro está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H18C/Y143C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1).

50 En una modalidad adicional, la GH del conjugado comprende un mutante sencillo de cys y un enlace disulfuro adicional entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

55 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C y/o R94C/D107C en la SEQ ID NO: 1.

60 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1.

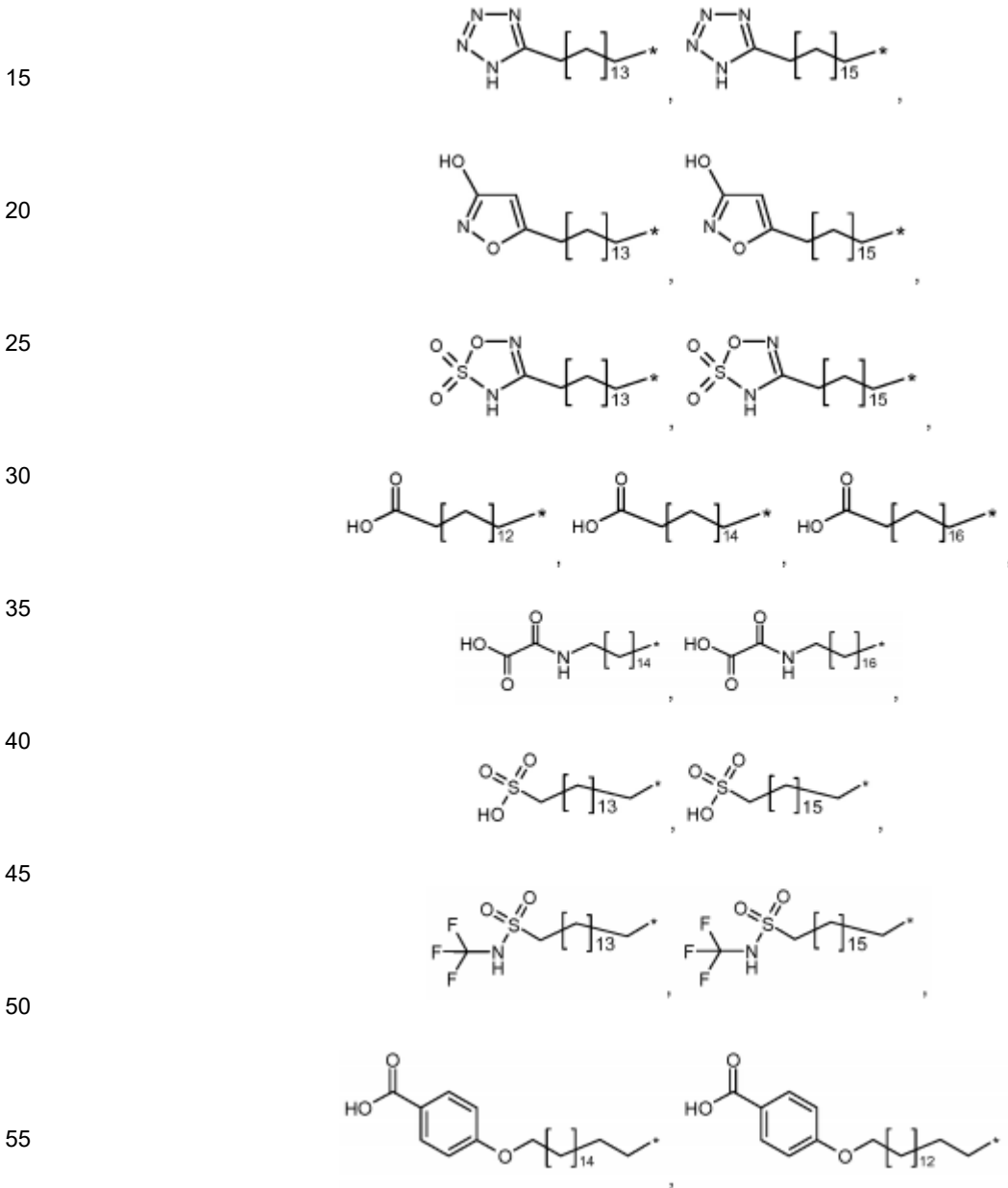
65 En una modalidad adicional, el enlace disulfuro adicional está entre uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C y/o S85C/S144C en la SEQ ID NO: 1.

ES 2 745 484 T3

En una modalidad adicional, la GH comprende una mutación única de cisteína en L2 y un enlace disulfuro adicional que conecta un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (H3), con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o hélice 2 (correspondiente a AA 72-98).

5 En una modalidad, la GH comprende una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo siguiente: A98C/Q84C/Y143C, A98C/S85C/Y143C, A98C/S85C/S144C, N99C/Q84C/Y143C, N99C/S85C/Y143C, N99C/S85C/S144C, S101C/Q84C/Y143C, S101C/S85C/Y143C, S101C/S85C/S144C, L101C/Q84C/Y143C, L101C/S85C/Y143C, L101C/S85C/S144C, C102C/Q84C/Y143C, C102C/S85C/Y143C y C102C/S85C/S144C.

10 El residuo de unión a la albúmina (A) se selecciona de



60

65

en donde * indica la unión a B a través de W.

En una modalidad adicional W tiene la fórmula

5 $-W_7-Y-$,

en donde

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

10 17 es 0-6,

15 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,

20 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 modalidades adicionales B comprenden o consiste en uno o más motivos OEG, y/o gamma-Glu, como se describió anteriormente.

Aún en otra modalidad B tiene la fórmula

25 $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

en donde

30 X_1 es $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 es $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

35 X_3 es $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$,

X_4 es $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$,

11 , 12 , 13 , 14 , 15 e 16 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 el arilo y grupos 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, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ o $-OH$,

55 $D1$, $D2$, $E1$ y $E2$ se seleccionan independientemente de $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C)R^7-$ o um enlace de valencia; en donde R^6 y R^7 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo, W_1 a W_5 se seleccionan independientemente de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde $s2$ es 0 o 1.

60 W_6 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -alquilo, $-C(O)NHC_{1-6}$ -alquilo o un enlace valencia; en donde $s1$ es 0 o 1 y el grupo C_{1-6} -alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ o $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X_4 .

65 En una modalidad adicional 11 , 12 , 13 , 14 , 15 e 16 son independientemente 0-6.

ES 2 745 484 T3

En una modalidad adicional m1, m3, m4, m6 y m7 son independientemente 0-6.

En una modalidad adicional m2 y m5 son independientemente 0-10.

5 En una modalidad adicional n1, n2, n3 y n4 son independientemente 0-10.

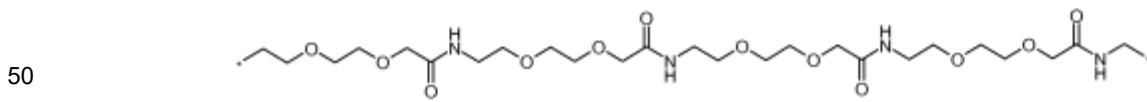
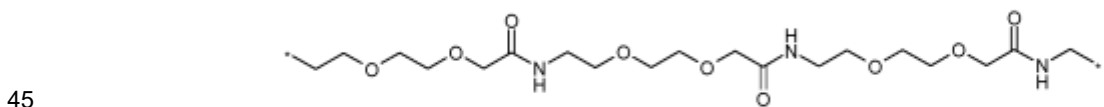
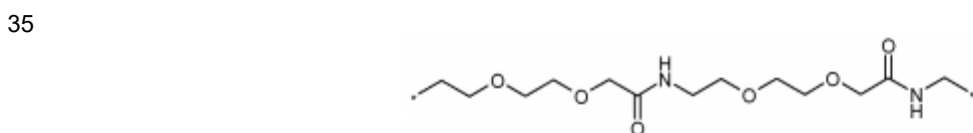
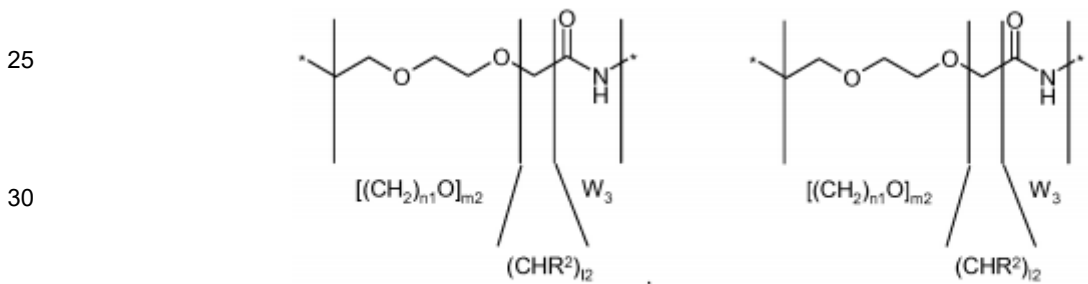
En una modalidad adicional D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R)⁶- o un enlace de valencia.

En una modalidad adicional E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R)⁶- o un enlace de valencia.

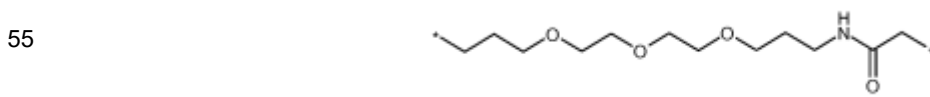
10 En una modalidad adicional W₁ a través de W₈ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace de valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

En otra modalidad R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH.

20 En una modalidad adicional -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}]_{n2}- y -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}]_{n4}-, en donde E1 y E2 son -O-, se seleccionan de



, y

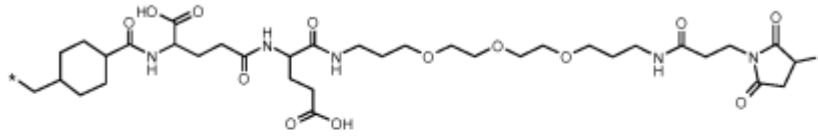


en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

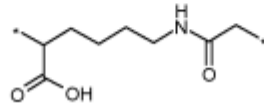
60 En una modalidad adicional X₄ es un enlace de valencia y W₆ se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

65 En una modalidad adicional B se selecciona de

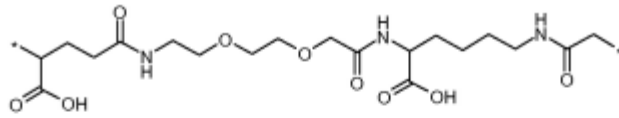
5



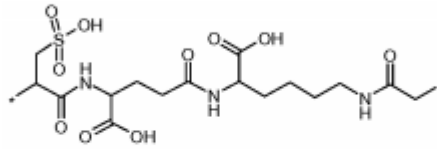
10



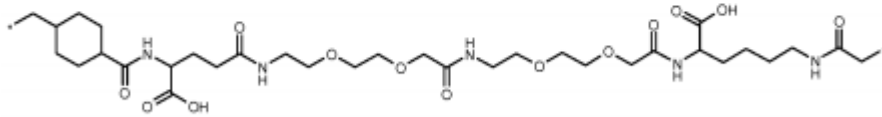
15



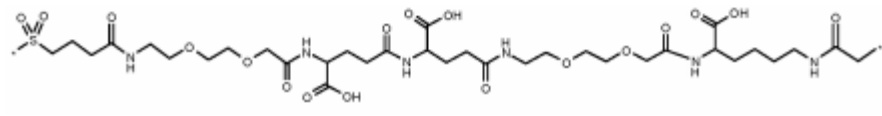
20



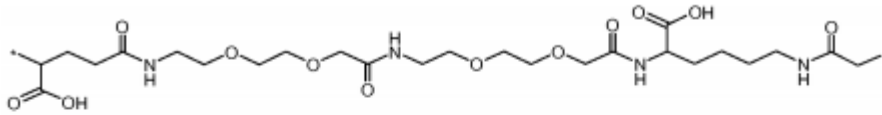
25



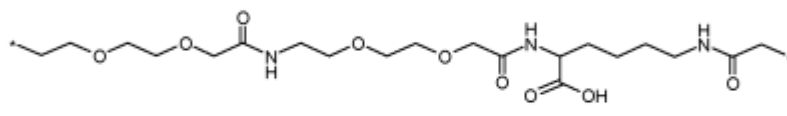
30



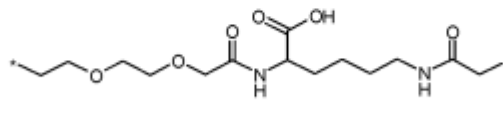
35



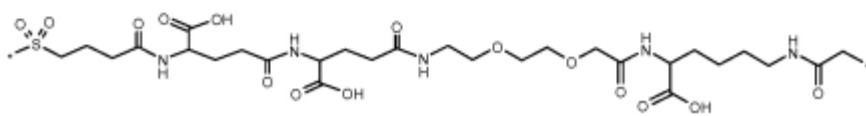
40



45



50

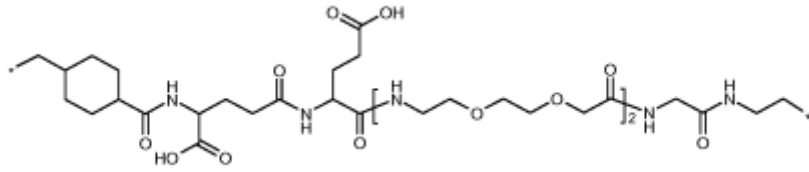


55

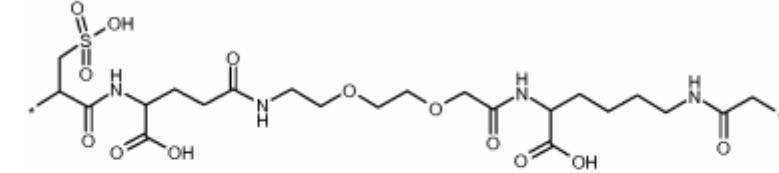
60

65

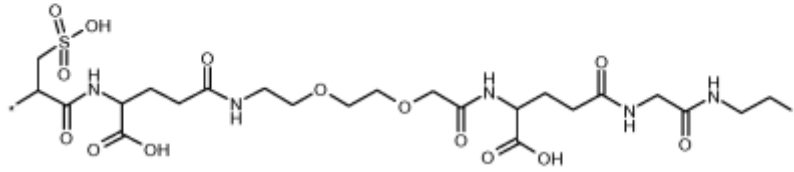
5



10



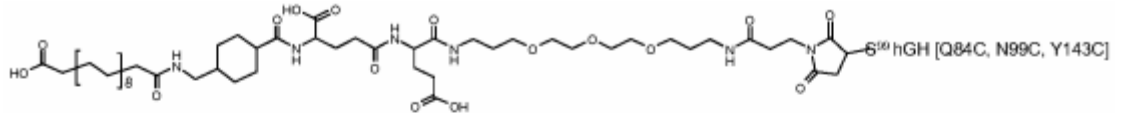
15



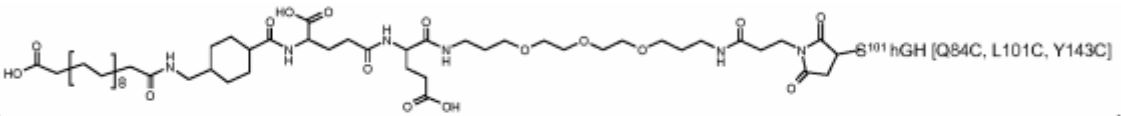
20

En una modalidad adicional el conjugado de GH se selecciona de

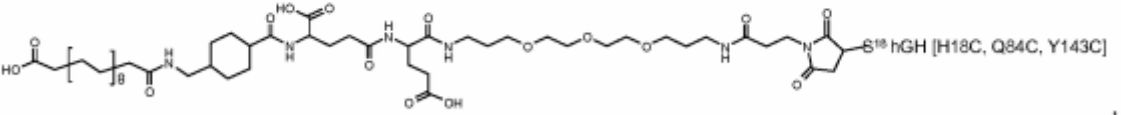
25



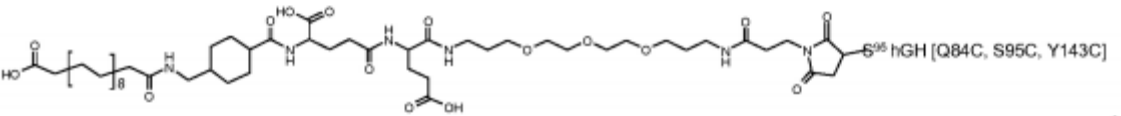
30



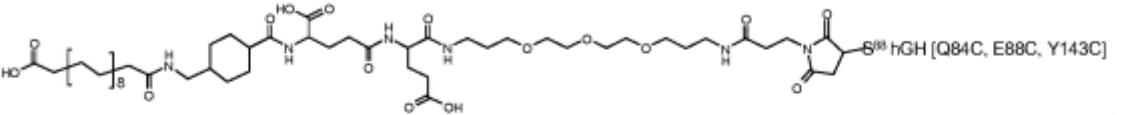
35



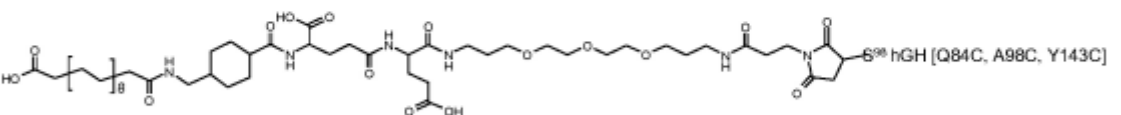
40



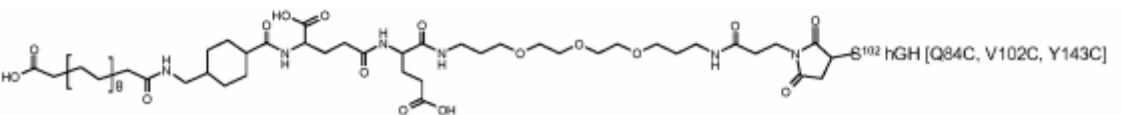
45



50



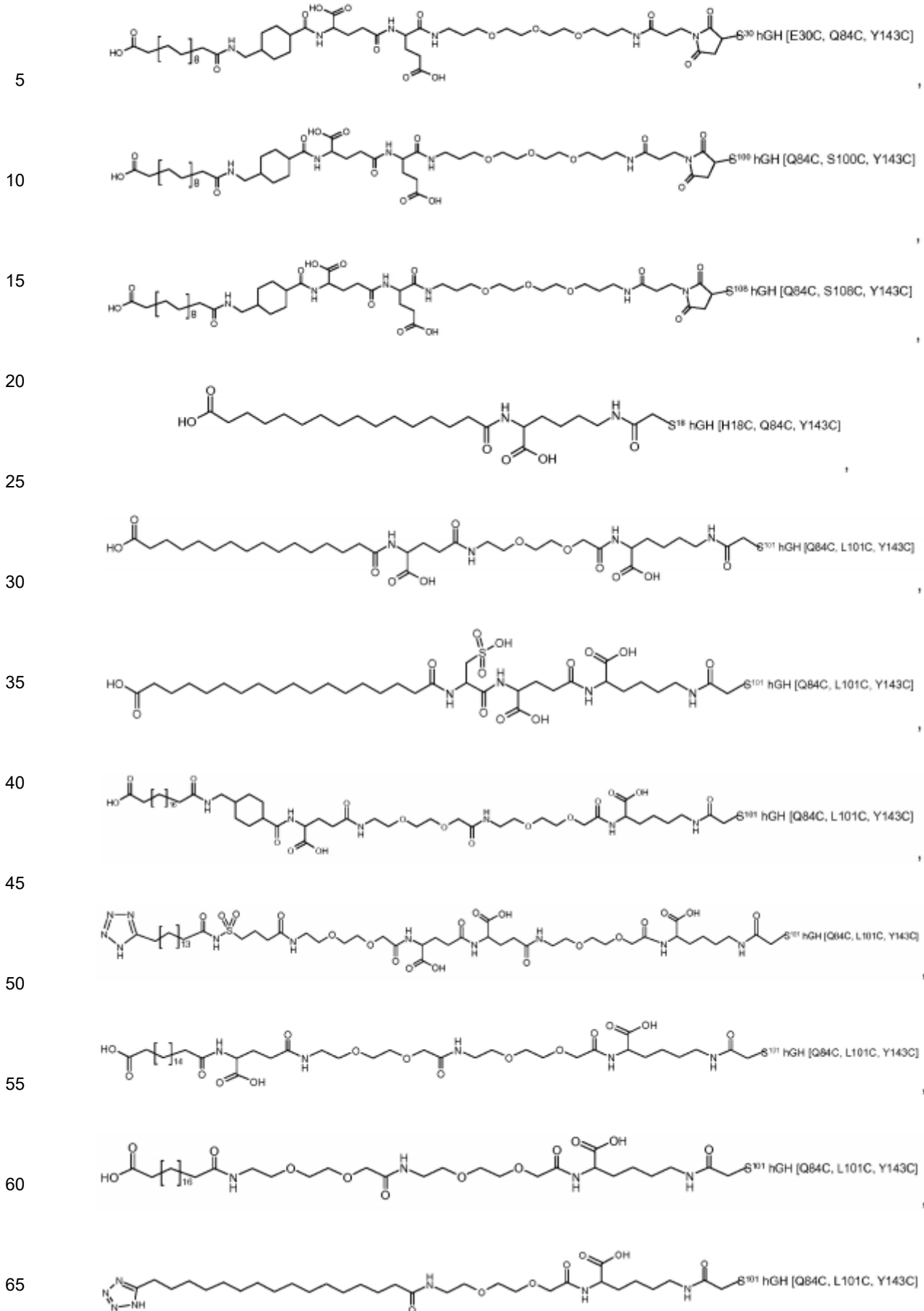
55



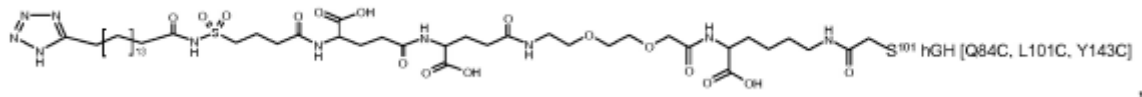
60

65

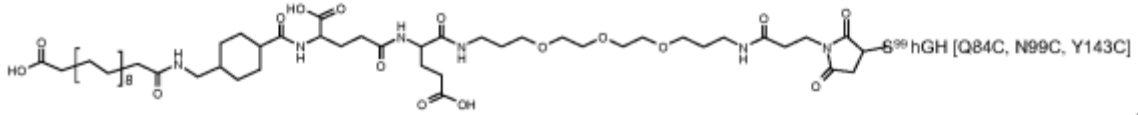
ES 2 745 484 T3



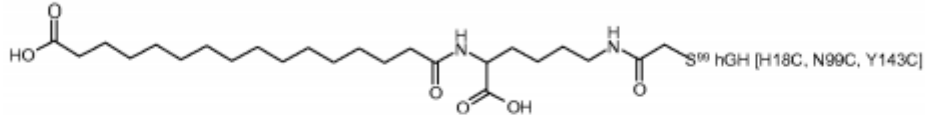
5



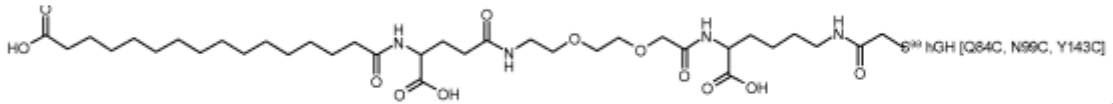
10



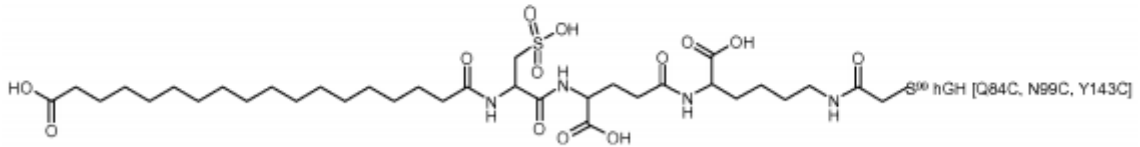
15



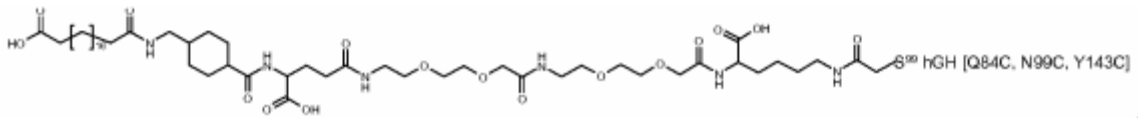
20



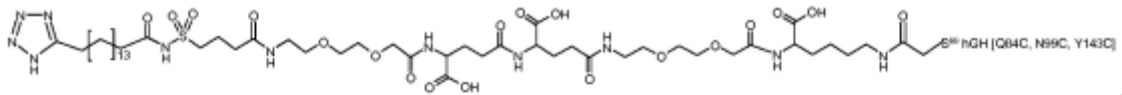
25



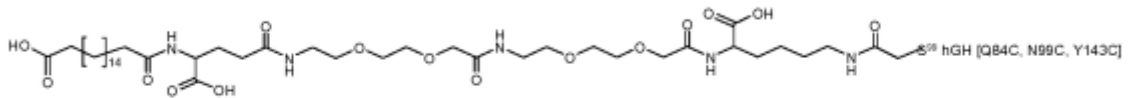
30



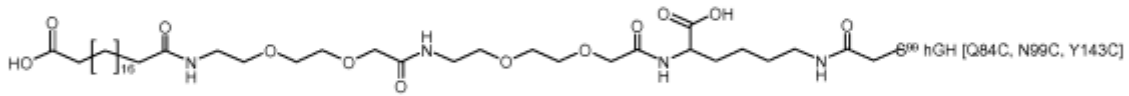
35



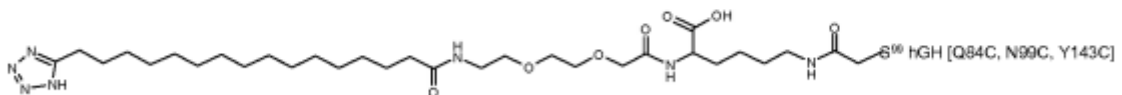
40



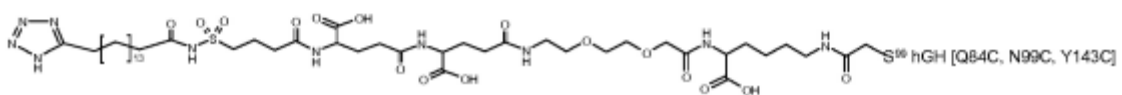
45



50



55



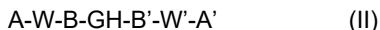
60

65 Típicamente el conjugado de la presente invención tiene un residuo de unión a la albúmina (A) unido a través de un espaciador hidrofílico (B), tal como un espaciador hidrofílico (B), al compuesto de la hormona de crecimiento (GH).

Sin embargo, el compuesto de la hormona de crecimiento (GH) puede unirse a dos residuos de unión a albúmina a través de un espaciador hidrofílico.

Se describe que el conjugado de la hormona de crecimiento puede tener la fórmula (II):

5



en donde

10

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con una mutación única de Cys,

B y B' son independientemente espaciadores hidrofílicos unidos al residuo de azufre de la mutación de Cys,

15

W es un grupo químico que une A y B,

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

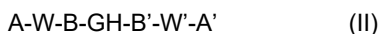
A y A' representan independientemente un residuo de unión a la albúmina, y

20

sales farmacéuticamente aceptables de este.

Además, se describe que el conjugado de la hormona de crecimiento puede tener la fórmula (II):

25



en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con un puente disulfuro adicional,

30

B y B' independientemente son espaciadores hidrofílicos,

W es un grupo químico que une A y B,

35

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

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

sales farmacéuticamente aceptables de este.

40

Además, se describe que el conjugado de la hormona de crecimiento puede tener la fórmula (II):



en donde

45

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional,

50

B y B' son independientemente espaciadores hidrofílicos unidos al residuo de azufre de la mutación de Cys,

W es un grupo químico que une A y B,

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

55

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

sales farmacéuticamente aceptables de este.

60

En el conjugado de fórmula (II) como se describió anteriormente 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 en la presente descripción. Por lo tanto, cualquiera de las modalidades de W, A, y B en la presente descripción 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.

65

Las modalidades anteriores, así como también las modalidades que se describen en el presente documento, deben verse como referencia a cualquiera de los aspectos descritos en la presente descripción, así como también cualquiera de las modalidades descritas en la presente, a menos que se especifique que una modalidad se refiere a un aspecto o aspectos determinados de la presente invención.

5 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.

15 En una modalidad adicional GH representa un compuesto de la 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) (SEQ ID NO:1). En modalidades adicionales, GH tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 % o tal como al menos 99 % de identidad con hGH (SEQ ID NO: 1). En modalidades adicionales, dichas identidades con hGH se acoplan con al menos 10 %, tal como 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.

25 En modalidades adicionales B comprende o consiste en uno o más motivos OEG, y/o gamma-Glu, como se describió anteriormente.

En una modalidad adicional del conjugado de la fórmula (I) o (II), el espaciador hidrofílico B tiene la fórmula

30
$$-X_1-X_2-X_3-X_4-$$

en donde

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

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

l_1, l_2, l_3, l_4, l_5 e l_6 se seleccionan independientemente de 0-16,

45 m_1, m_3, m_4, m_6 y m_7 se seleccionan independientemente de 0-10,

m_2 y m_5 se seleccionan independientemente de 0-25,

n_1, n_2, n_3 y n_4 se seleccionan independientemente de 0-16,

50 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,

55 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 o -OH,

60 D_1, D_2, E_1 y E_2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R₆)-, -N(C(O)R₇)- o un enlace de valencia; en donde R_6 y R_7 representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W_1 a W_5 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 s_2 es 0 o 1,

65 W_6 se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde s_1 es 0 o 1 y el grupo alquilo se sustituye opcionalmente

con oxo, pirrolidina-2,5-diona, $\text{NHC(O)CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ o $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

5 En otra modalidad W₁ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ o un enlace de valencia. Típicamente, W₁ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , o $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$.

En otra modalidad W₂ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ o un enlace de valencia. Típicamente, W₂ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , o $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$.

10 En otra modalidad W₃ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ o un enlace de valencia. Típicamente, W₃ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , o $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$.

15 En otra modalidad W₄ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ o un enlace de valencia. Típicamente, W₄ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , o $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$.

En otra modalidad W₅ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ o un enlace de valencia. Típicamente, W₅ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , o $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$.

20 En una modalidad adicional W₆ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$, $\text{-NHC(O)C}_{1-6}\text{-alquilo}$, $\text{-C(O)NHC}_{1-6}\text{-alquilo}$ o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con pirrolidina-2,5-diona, $\text{-NHC(O)CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ o $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄. Típicamente, W₆ se selecciona de -C(O)NH- , -NHC(O)- , $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$ o $\text{-NHC(O)C}_{1-6}\text{-alquilo}$.

25 En una modalidad adicional, D1, D2, F son todos enlaces de valencia, I6 es 0, y W6 se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, $\text{-NHC(O)CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ o $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

30 En otra modalidad R¹ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$. Típicamente, R¹ se selecciona de -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o $\text{-S(O)}_2\text{OH}$.

35 En otra modalidad R² se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$. Típicamente, R² se selecciona de -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o $\text{-S(O)}_2\text{OH}$.

40 En otra modalidad R³ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$. Típicamente, R³ se selecciona de -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o $\text{-S(O)}_2\text{OH}$.

En otra modalidad R⁴ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$. Típicamente, R⁴ se selecciona de -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o $\text{-S(O)}_2\text{OH}$.

45 En otra modalidad R⁵ se selecciona de hidrógeno, -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , $\text{-S(O)}_2\text{OH}$. Típicamente, R⁵ se selecciona de -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH , -C(O)NH_2 , o $\text{-S(O)}_2\text{OH}$.

50 En otra modalidad E1 se selecciona de -O- o $\text{-N(R}^6\text{)-}$, o un enlace de valencia. Típicamente, E1 se selecciona de -O- .

En otra modalidad E2 se selecciona de -O- o $\text{-N(R}^6\text{)-}$, o un enlace de valencia. Típicamente, E2 se selecciona de -O- .

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

55 En otra modalidad E1 y E2 son ambos $\text{-N(R}^6\text{)-}$.

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

60 En otra modalidad D1 se selecciona de -O- o $\text{-N(R}^6\text{)-}$, o un enlace de valencia. Típicamente, D1 se selecciona de $\text{-N(R}^6\text{)-}$.

En otra modalidad D2 se selecciona de -O- o $\text{-N(R}^6\text{)-}$, o un enlace de valencia. Típicamente, D1 se selecciona de $\text{-N(R}^6\text{)-}$.

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

65 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 una modalidad adicional I4 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En una modalidad adicional I5 es 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

5

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

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

10 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.

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

15

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

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

20

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.

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

25

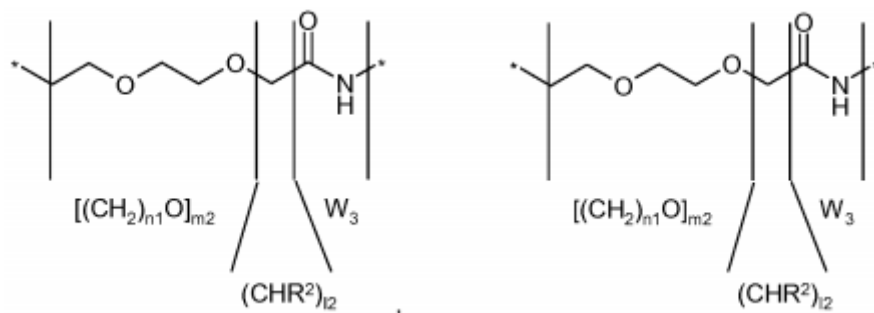
En otra modalidad n3 es 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

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

30

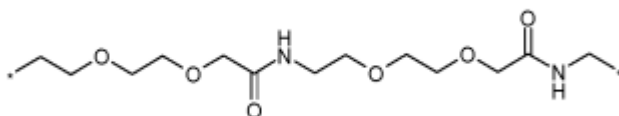
En otra modalidad X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ y X2 es $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$, en donde $-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ y $-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ se seleccionan de,

35

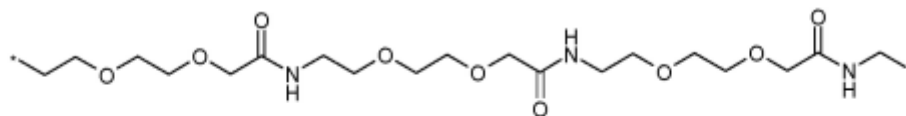


40

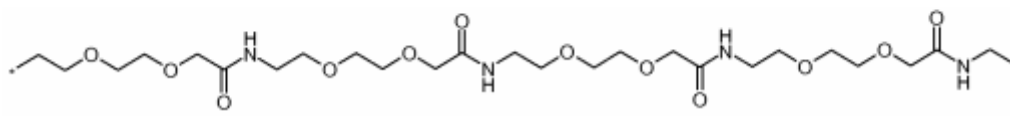
45



50



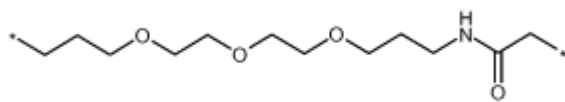
55



60

y

65



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 300 D a 1100 D.

5

Aún en otra modalidad W tiene la fórmula



10 en donde

Y es $-(CH_2)_{17}$ -C₃₋₁₀-Cicloalquil-W₈- o un enlace de valencia,

15

I₇ es 0-6,

W₇ se selecciona 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)-, $-(CH_2)_{s3}$ -, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, o un enlace de valencia; en donde s₃ es 0 o 1,

20

W₈ se selecciona 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)-, $-(CH_2)_{s4}$ -, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, o un enlace de valencia; en donde s₄ es 0 o 1.

25

En una modalidad de W Y es $-(CH_2)_{17}$ -ciclohexil-W₈-.

En otra modalidad Y es un enlace de valencia.

30

En una modalidad W₇ 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, W₇ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NHS(O)₂.

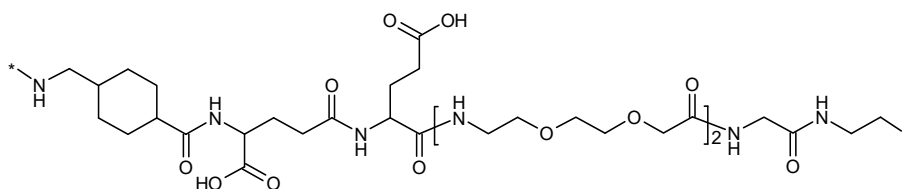
En otra modalidad W₈ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)- o un enlace de valencia. Típicamente, W₈ se selecciona de -C(O)NH-, -NHC(O)-, o -C(O)NHS(O)₂.

35

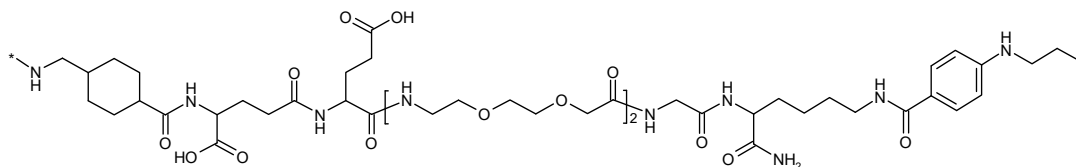
En otra modalidad I₇ es 0 o 1.

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

40

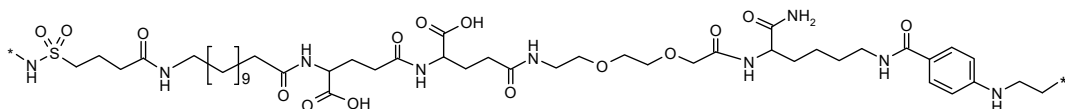


45



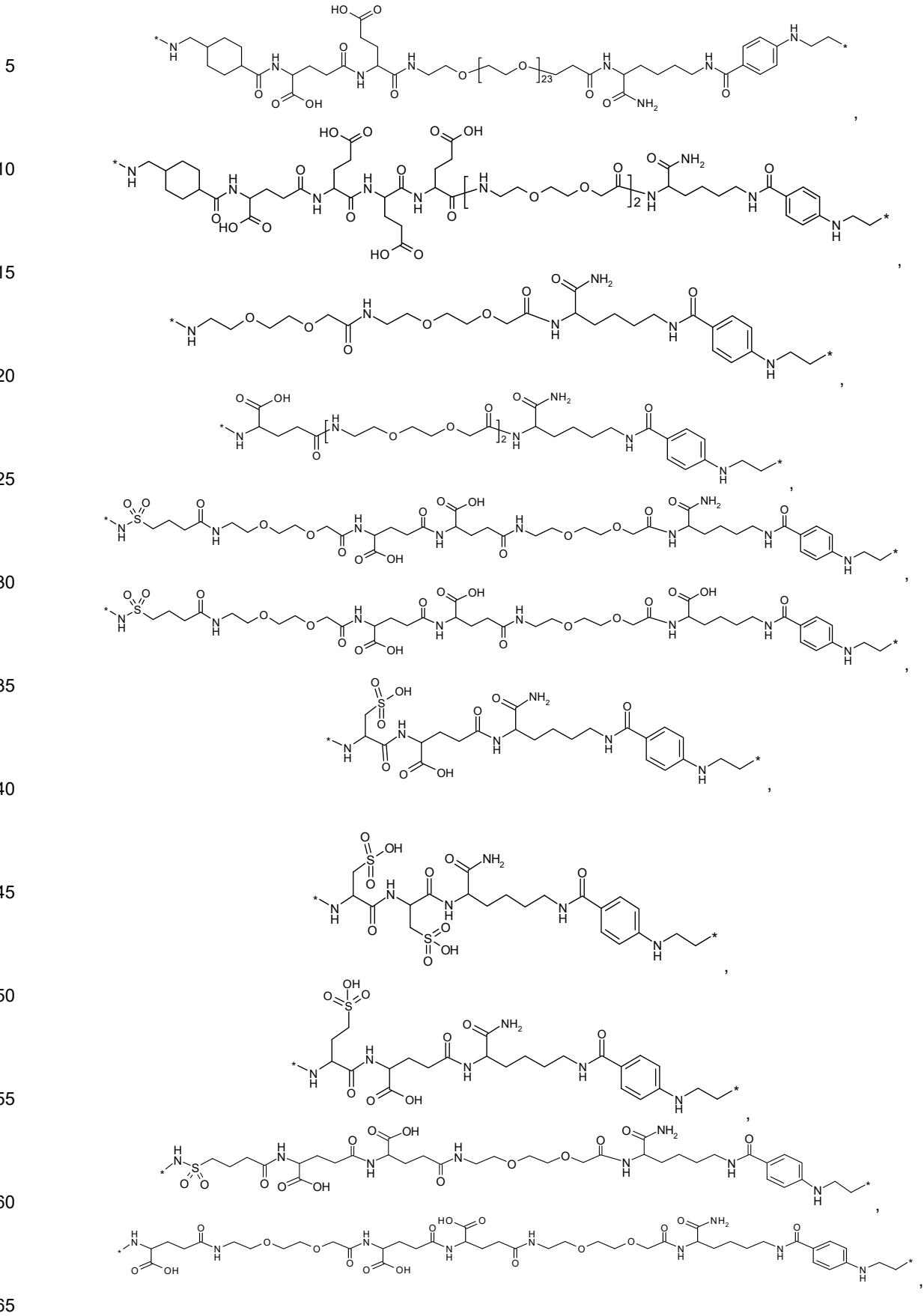
50

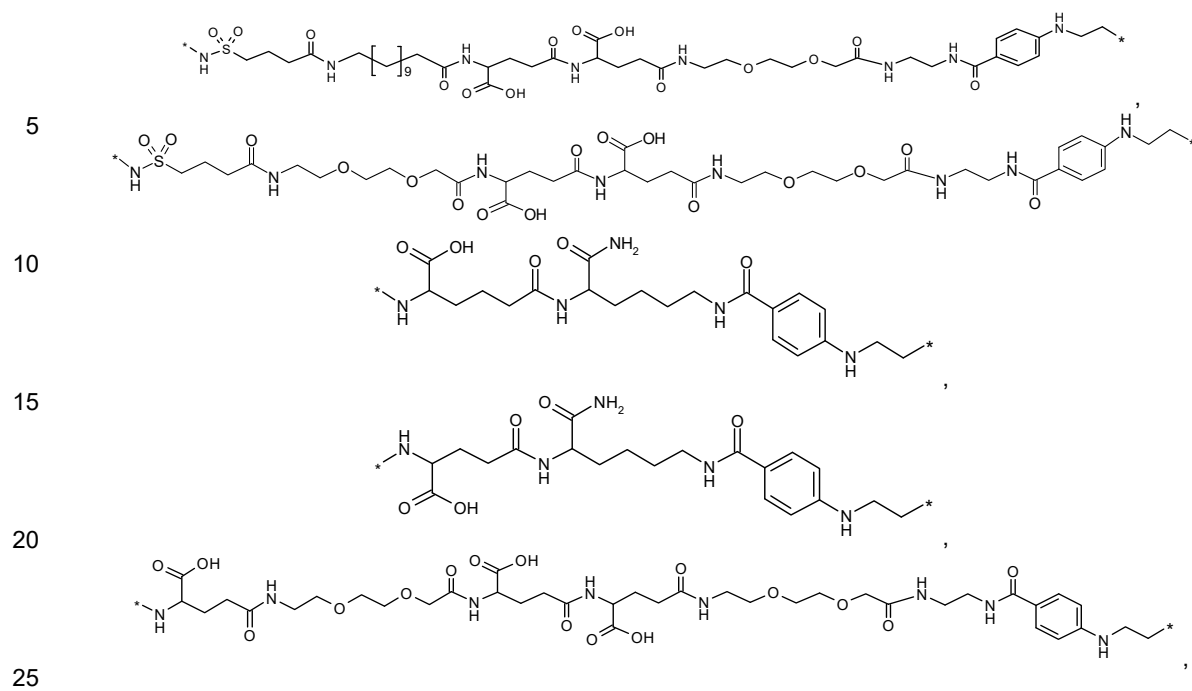
55



60

65





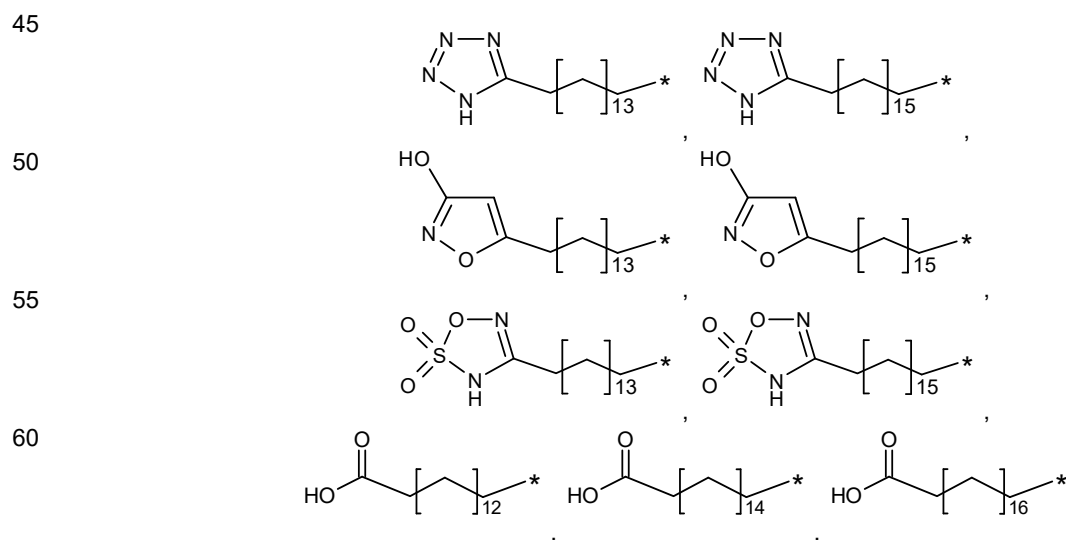
en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

30 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 .

35 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.

40 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.

El residuo de unión a la albúmina (A) se selecciona de

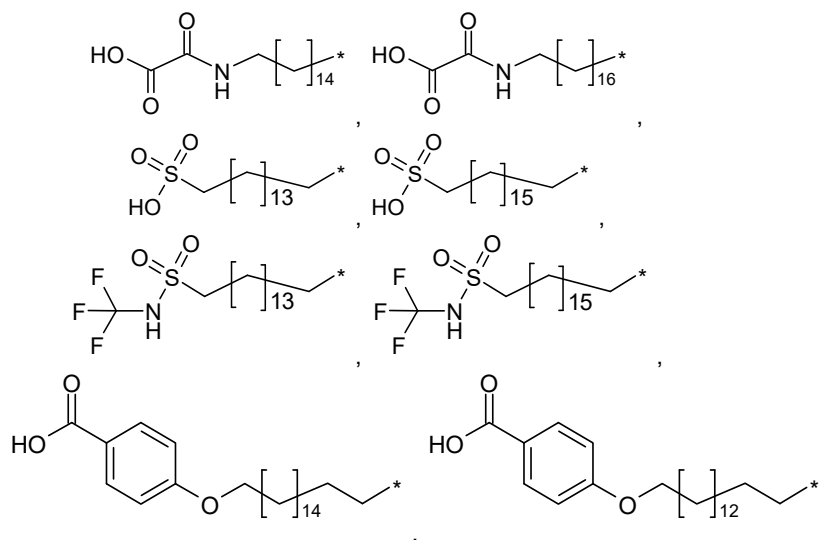


5

10

15

20



en donde * indica la unión a B a través de W.

25

30

35

40

45

50

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 o dos 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. Preferentemente, se usa una transglutaminasa para introducir un espaciador hidrofílico en el residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40 o la posición 141 en la SEQ ID NO: 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 SEQ ID NO: 1).

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.

Se describe que 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 SEQ ID NO: 1.

Se describe que 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 SEQ ID NO: 1.

Se describe que 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 (SEQ ID NO: 1).

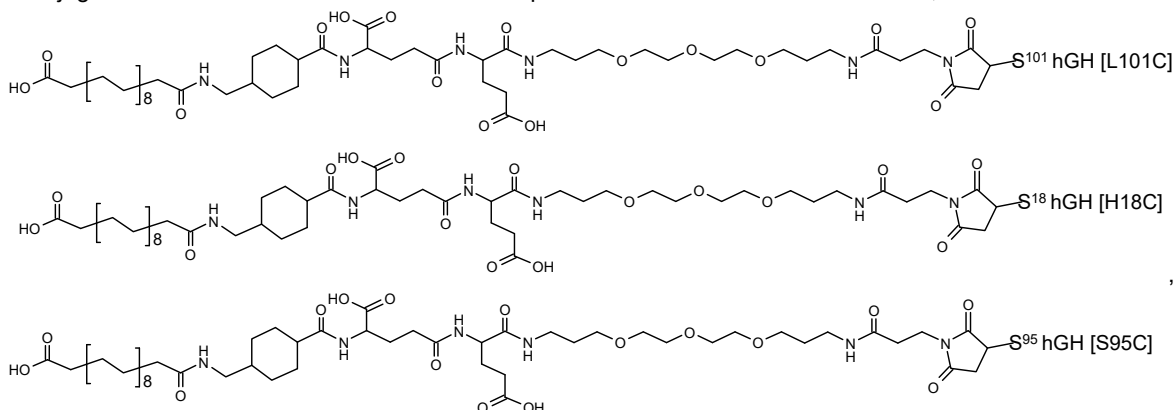
Se describe que el residuo de unión a la albúmina por medio de un espaciador hidrofílico se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40, la posición 141 y al residuo N-terminal del compuesto de hormona de crecimiento, tal como hGH (SEQ ID NO: 1).

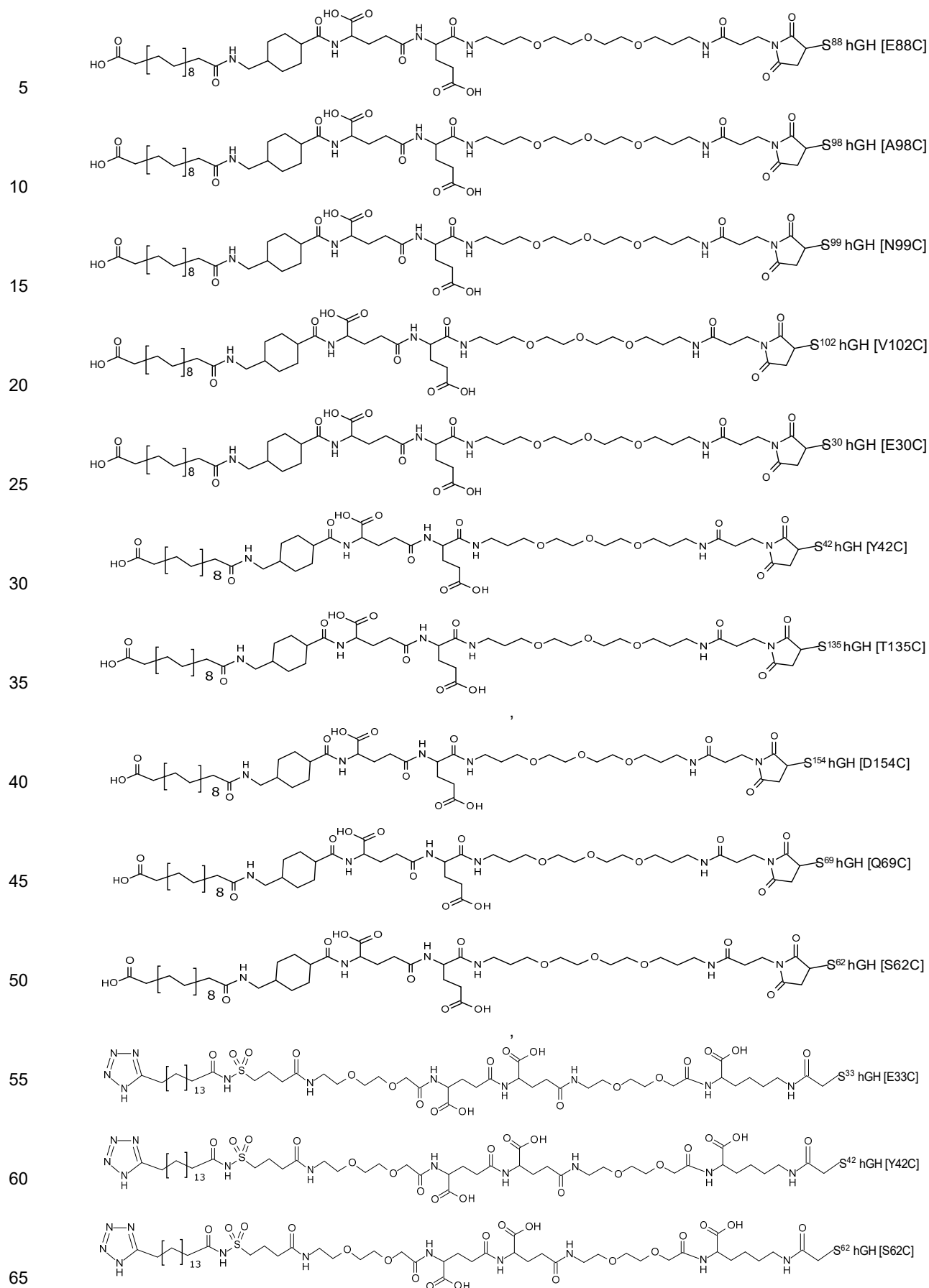
Los conjugados de la hormona de crecimiento de la presente invención se seleccionan de,

55

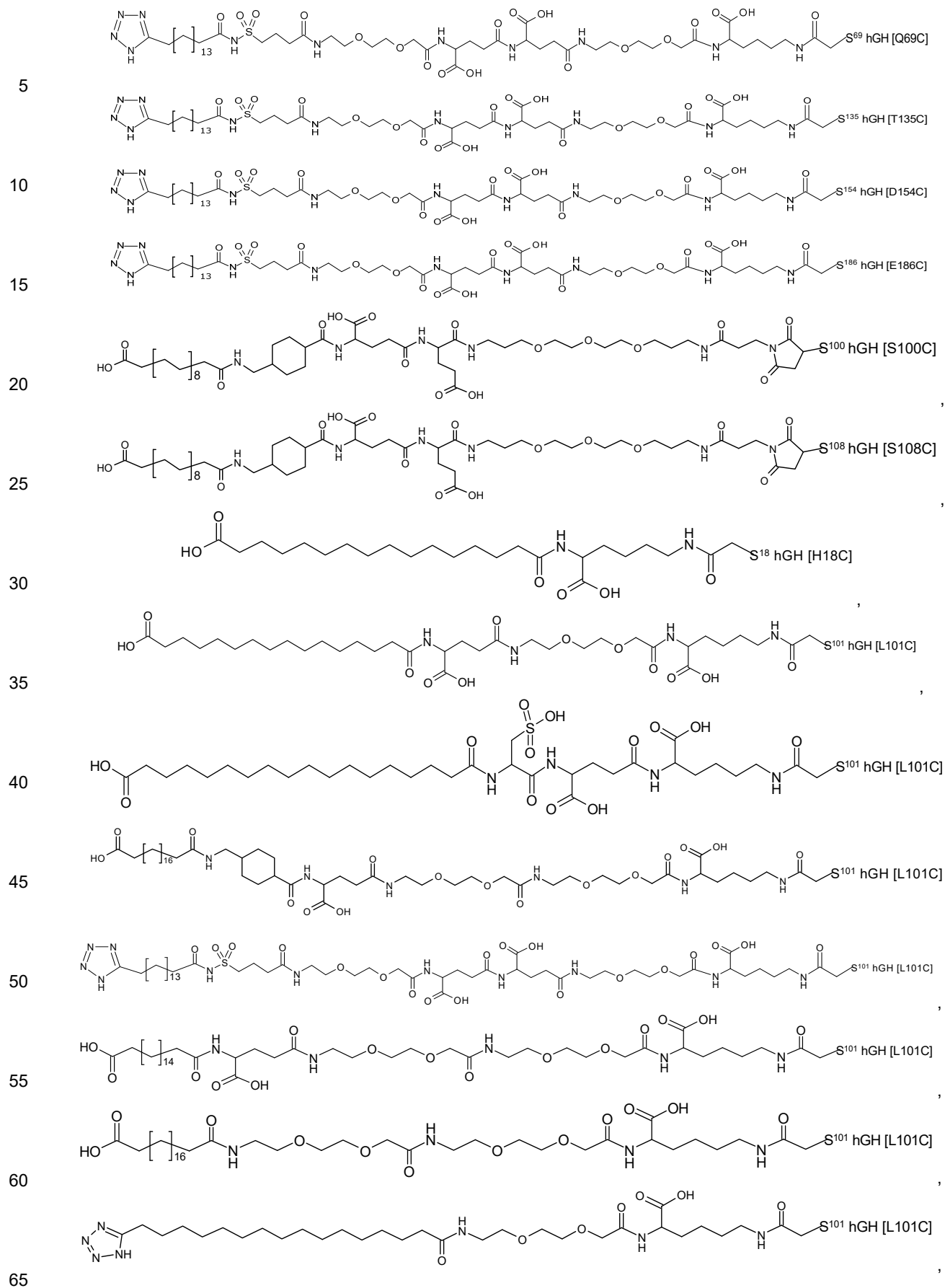
60

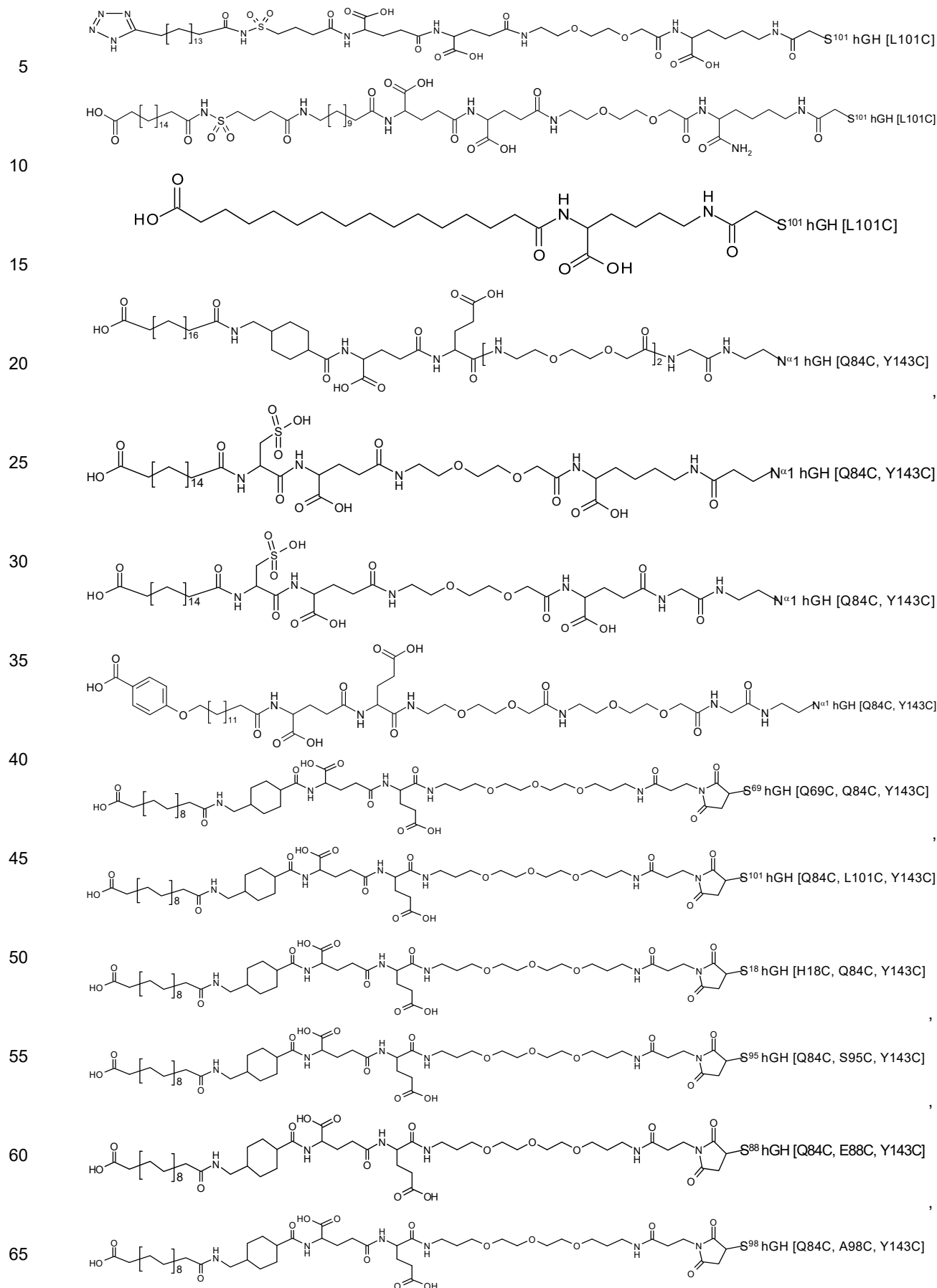
65



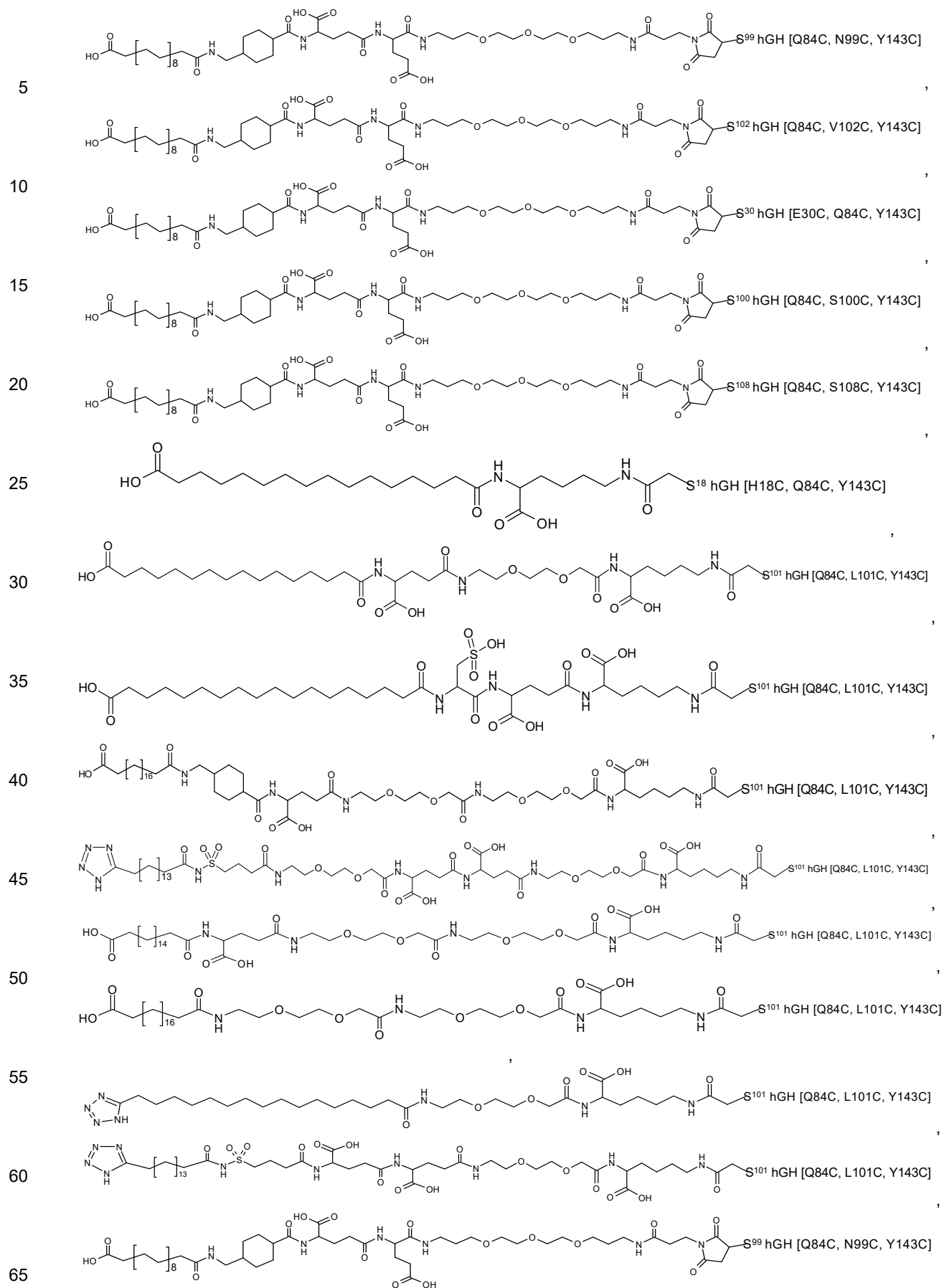


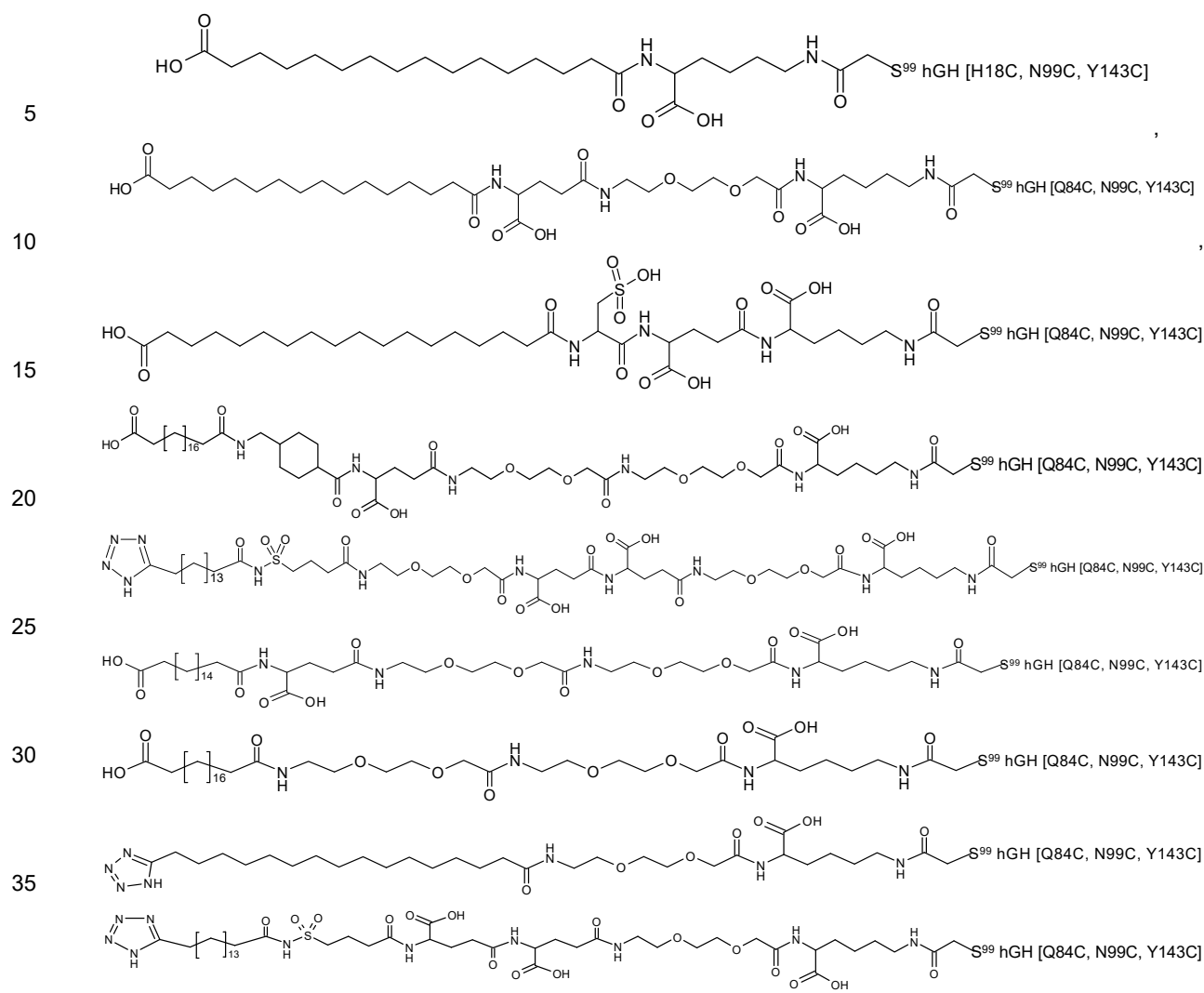
ES 2 745 484 T3





ES 2 745 484 T3





40 En otro aspecto la presente invención se refiere a un conjugado de la 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 de este farmacéuticamente aceptable para usar en la terapia. Además, en el conjugado de la 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 la hormona de crecimiento tiene la fórmula (I) o (II).

45

En otro aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la 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 de este farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.

50

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).

55

60

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

65

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.

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 abertura 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 abertura 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, suppl.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).

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, *Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10915-10919, (1992); Penalización por Hueco: 12, Penalización por longitud del hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

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.

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.

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.

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.

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.

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 %, con relación a la inmunogenicidad para ese individuo de la GH parental. El término "protección a proteasa" o "proteasa protegida" como se usa en la presente pretende indicar que la GH conjugada de la presente invención es más resistente a la peptidasa o proteasas plasmáticas que la GH parental. 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. Tal protección a proteasa puede medirse mediante el método del Ejemplo A descrito en la presente descripción.

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.

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 65 000 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. En particular, la invención proporciona 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 1er 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 la hormona de crecimiento de acuerdo con la fórmula (I) o (II).

En otro aspecto, la invención 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 la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II).

En otra modalidad, la invención se refiere al uso de un conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) o (II) en la producción 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 está dentro del alcance de la presente invención el uso de un conjugado de la 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, está además dentro del alcance de la presente invención el uso de un conjugado de la 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

Conjugación enzimática:

En la preparación de un conjugado de la 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. El conjugado de la hormona de crecimiento de la presente invención puede prepararse mediante muchos métodos diferentes, más adelante se muestran ejemplos no limitantes.

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

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 *S. 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 WO1996/06931 (por ejemplo transglutaminasa de *Bacillus lypidicus*) y el documento WO1996/22366, ambas son. 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 GH 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 usado. 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 (SEQ ID NO: 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, aunque no todas estas están fácilmente disponibles para la modificación ni son adecuadas para las modificaciones, dado que esto conducirá a una potencia de unión disminuida a la proteína de unión a la hormona de crecimiento, lo que conduce a una actividad biológica disminuida. 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.

Química I (No de acuerdo con las reivindicaciones)

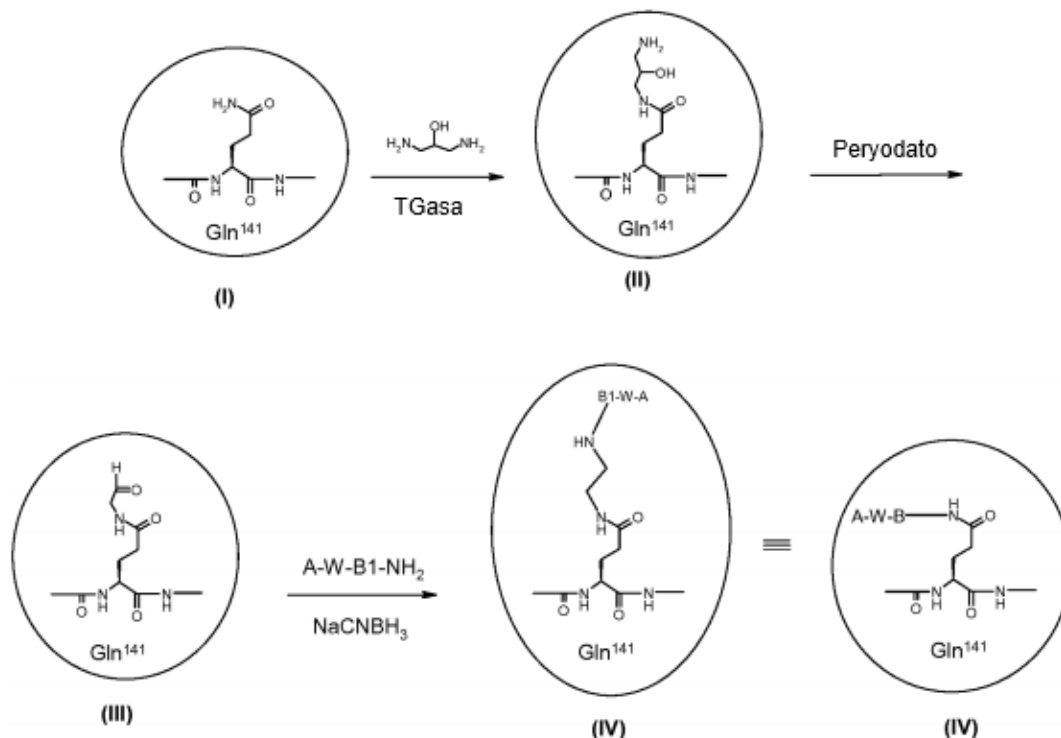
En un aspecto la presente invención se refiere a una preparación de un conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) en donde un compuesto de GH se trata con un grupo modificador de las propiedades mediante el uso de química catalizada por TGasa. Inicialmente, una funcionalidad de aldehído o una cetona se instala mediante una reacción de dos etapas mediante el uso de aminoalcoholes que subsecuentemente se tratan con peryodato para generar una función aldehído o ceto por escisión oxidativa. Los ejemplos de aminoalcoholes incluyen 1,3-diamino-2-propanol y 1-amino-2,3-dihidroxiopropano.

En otro aspecto la presente invención se refiere a una preparación de un conjugado de la hormona de crecimiento de fórmula (I) 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 (III → IV).

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

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 (III) 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 (III) necesario para la realización de la invención descrita en la presente.

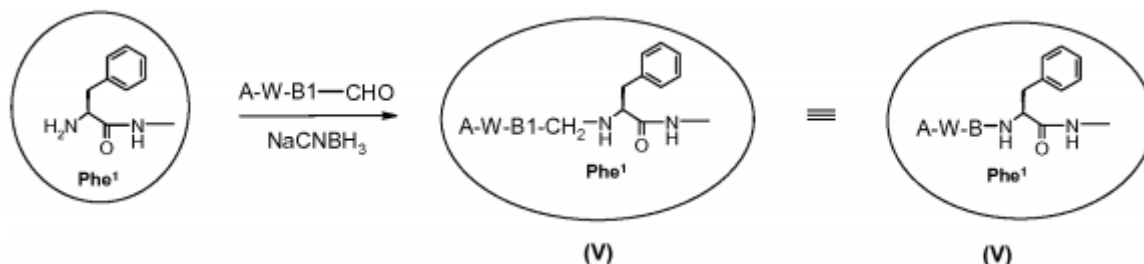
En una modalidad, el conjugado A-W-B-GH (IV) se prepara como se ilustra a continuación:



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 (II). La GH modificada (II) se trata con peryodato para escindir el aminoalcohol para proporcionar un aldehído derivado de GH (III). La conjugación del aldehído de GH (III) con A-W-B1-NH₂ se produce por alquilación reductora (III → IV). La alquilación reductora ejemplificada en la presente descripción se conoce bien en la técnica y resulta en compuestos de GH (IV) modificados en la posición Gln(141) y/o 40.

Química II (No de acuerdo con las reivindicaciones)

En una modalidad, el conjugado A-W-B-GH se prepara mediante el uso de aminación reductora en el N-terminal de GH como se ilustra a continuación:



La conjugación de GH a-W-B1-CHO se produce mediante alquilación reductora (GH → V). La alquilación reductora como se ejemplificó anteriormente es bien reconocida en la técnica para modificar el N-terminal de GH.

Química III

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

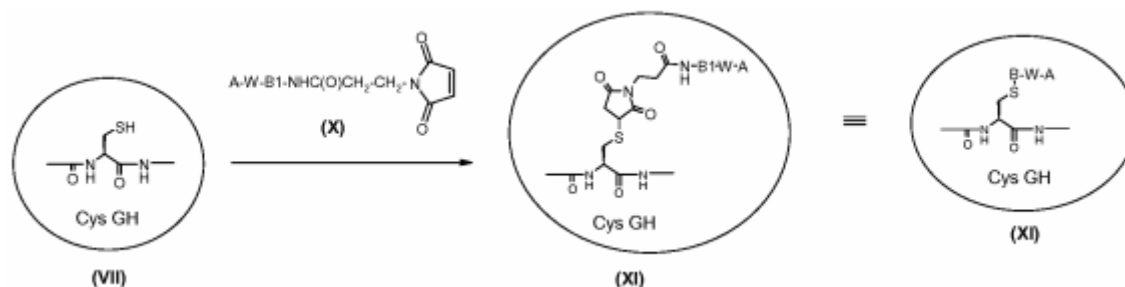


En donde el residuo de cisteína opcionalmente se protege como un disulfuro mezclado (VI) (GH-S-S-R) con R siendo un resto orgánico pequeño. Los ejemplos de disulfuros mezclados pueden incluir disulfuros entre cistamina (R = -CH₂CH₂NH₂); cisteína (R = -CH₂)₂CH(C(O)OH)NH₂); homocisteína (R = -CH₂)₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂); y glutatión (R = -CH₂)₂CH(C(O)NH-CH₂C(O)OH)NH-C(O)CH₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂).

El proceso de derivatización usa un enlazador de unión a la albúmina A-W-B1-LG en donde LG representa un grupo saliente inorgánico tal como -Cl, -Br, -I o un grupo saliente orgánico tal como mesilato o tosilato. La conjugación de GH con A-W-B1-LG se produce mediante sustitución nucleofílica (VII → IX).

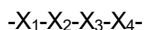
Química IV

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



El compuesto de GH de Cys desprotegido (VII) como se obtiene a partir de (VI) anterior puede hacerse reaccionar con un enlazador de unión a la albúmina sustituido con malimida (X) lo que proporciona el conjugado de GH A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-pirrolidin-2,5-diona-3-GH (XI).

en donde el espaciador hidrofílico B1 tiene la fórmula



5 en donde

X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}n2-$,

X2 es $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}n4-$,

10

X3 es $-[(CHR^5)_{l5}]_{m7}-$,

X4 es un enlace de valencia,

15 l1, l2, l3, l4, e l5 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,

20

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

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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

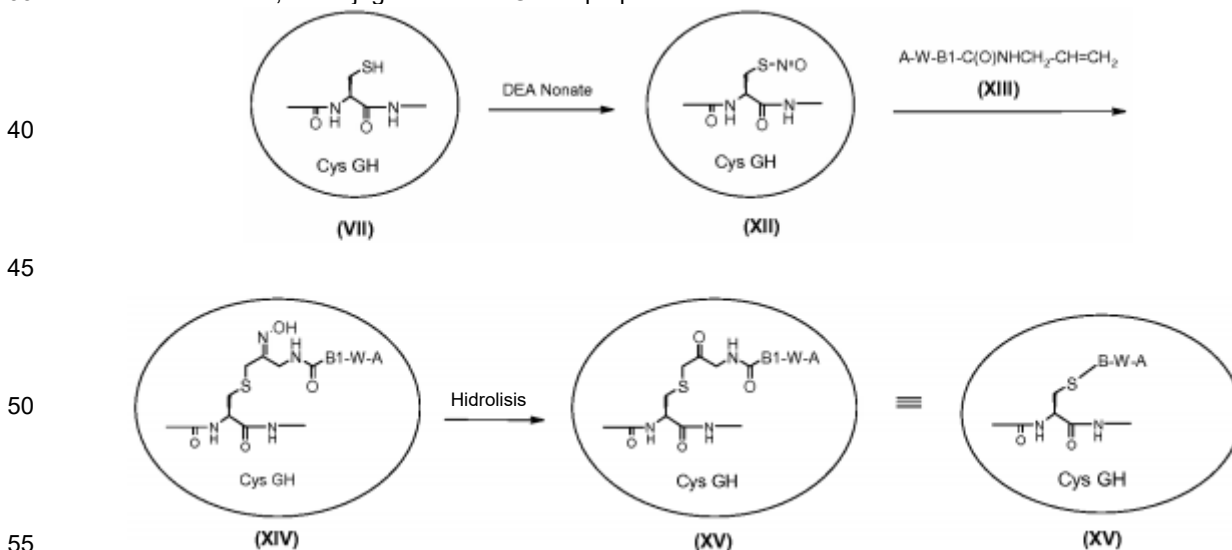
25

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, W₁ a W₅ 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.

30

Química V

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

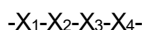


50

Los unidores de albúmina pueden enlazarse a derivados de GH de cys única mediante el uso de química de S-nitrosilo como se describe en el documento WO2009/024791.

60 El compuesto de GH de Cys desprotegido (VII) se somete a S-nitrosilación mediante la adición de un donante NO tal como DEA Nonate (Sigma Aldrich). La GH de cys única nitrosilada (GH) (XII) luego se hace reaccionar con un unidor de albúmina sustituido con alilamina (XIII) lo que proporciona oxima (XIV) que después de la hidrólisis proporciona el conjugado de GH A-W-B1-C(O)NHCH₂C(O)CH₂-Cys GH (XV)

65 en donde el espaciador hidrofílico B1 tiene la fórmula



en donde

5 X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X2 es $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

10 X3 es $-[(CHR^5)_{l5}]_{m7}-$,

X4 es un enlace de valencia,

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

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

m2 y m5 se seleccionan independientemente de 0-25,

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

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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

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

30 W₁ a W₅ 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.

35 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.

La GH puede modificarse en su C-terminal mediante el uso de carboxipeptidasa Y (EC. 3.4.16.5), y sustratos modificados adecuados como se describe en el documento WO2007/093594. Un procedimiento de dos etapas tal como se describe en B. Peschke y otros "C-Terminally PEGylated GH derivatives" *Bioorg. Med. Chem.* 15, 4382-4395, (2007), donde la alanina C terminal se intercambia enzimáticamente con N^ε-(4-acetilbenzoil)lisina, seguida por la reacción con derivados de unidor de albúmina de acuerdo con la invención.

Composiciones farmacéuticas

45 Otro propósito es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la hormona de crecimiento de la presente invención, tal como un conjugado de la 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.

55 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.

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

65 En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una solución acuosa de un conjugado de la hormona de crecimiento, tal como un conjugado de la 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.

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.

5 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(hidroxiometil)-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.

15 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, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-(p-clorfenoxi)propano-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.

25 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), 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.

50 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.

60 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.

65 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 (5ta ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead y otros 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, 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 metionina 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-metiltioglicerol, 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 alcoxlados (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), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilfosfocolina, lisolecitina del huevo de gallina, derivados del ácido fusídico - (por ejemplo tauro-dihidrofusidato 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-acilados, o derivados de lisina o arginina acilados en la cadena lateral, derivados N-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N-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 -D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, de Tetric), 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 la 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 la 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 de 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 sin unir es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

5 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 o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido, tales como complejos de metal cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

15 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*).

35 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 acuerdo con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

40 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.

45 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.

50 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.

55 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 (es decir, uno o más), a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente.

60 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*

65

medición particular también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente"; donde sea apropiado).

5 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.

10 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.

La cita 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.

15 A continuación se proporciona una lista de las modalidades que describe la invención pero que no forma parte de esta.

Lista de modalidades (no de acuerdo con las reivindicaciones)

20 Modalidad 1: Un conjugado de la hormona de crecimiento que comprende un compuesto de la hormona de crecimiento (GH) que tiene

a) una mutación única de Cys,

b) un puente disulfuro adicional, o

25 c) una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional,

en donde un residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a dicho GH, o

30 una sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. El conjugado de la modalidad 1, en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1), tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad con hGH, o GH es hGH (SEQ ID NO: 1).

35 3. El conjugado de la modalidad 1, en donde GH o el conjugado de GH tiene al menos 80 % de la actividad de la hormona del crecimiento de hGH.

40 4. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-3 en donde el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a un GH que tiene una mutación única de Cys.

5. El conjugado de la modalidad 4, en donde la mutación única de Cys se ubica en cualquiera de las regiones seleccionadas del extremo N-terminal, H1, H2, L2 o H3 de GH.

45 6. El conjugado de la modalidad 5, en donde la GH tiene una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C.

50 7. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-3 en donde el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a un GH que tiene un puente disulfuro adicional.

8. El conjugado de la modalidad 7, en donde el enlace disulfuro adicional está entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre los segmentos helicoidales.

55 9. El conjugado de cualquiera de las modalidades 7-8, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

60 10. El conjugado de cualquiera de las modalidades 7-9, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o H2.

11. El conjugado de cualquiera de las modalidades 7-10, en donde el enlace disulfuro adicional conecta L3 con H2.

65 12. El conjugado de cualquiera de las modalidades 7-11, en donde el puente disulfuro adicional está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C,

S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

5 13. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-3 en donde el residuo de unión a la albúmina a través de un espaciador hidrofílico se une a un GH que tiene una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional.

10 14. El conjugado de la modalidad 13 en donde la GH tiene una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C.

15 15. El conjugado de cualquiera de las modalidades 13-14, en donde el enlace disulfuro adicional está entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre los segmentos helicoidales.

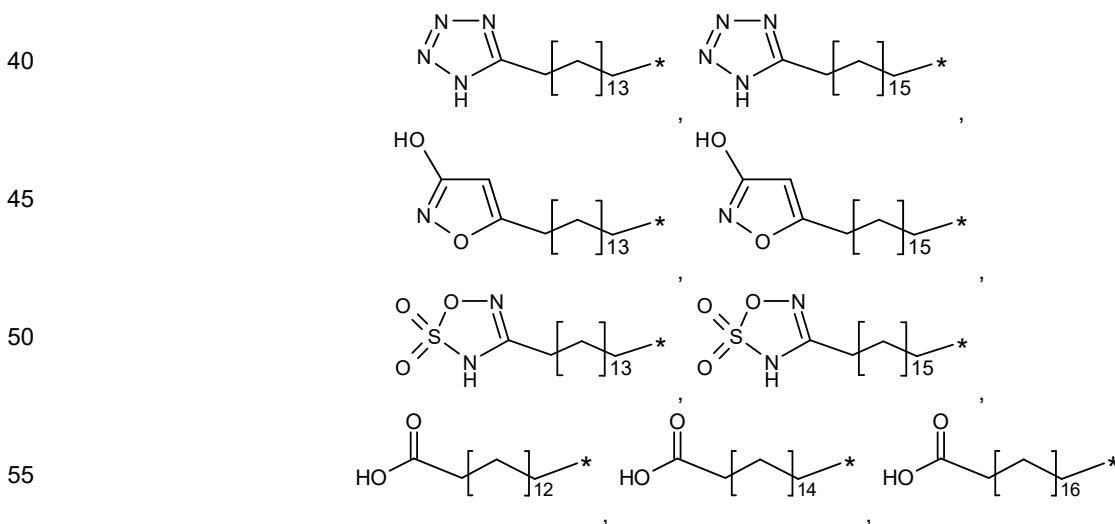
20 16. El conjugado de cualquiera de las modalidades 13-15, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

17. El conjugado de cualquiera de las modalidades 13-16, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o H2.

25 18. El conjugado de cualquiera de las modalidades 13-17, en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3), con la hélice B o H2.

30 19. El conjugado de cualquiera de las modalidades 13-18, en donde el puente disulfuro adicional está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

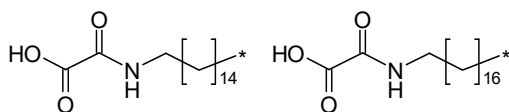
35 20. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-19, en donde el residuo de unión a la albúmina se selecciona de



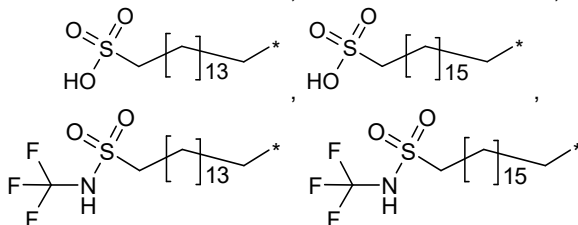
60

65

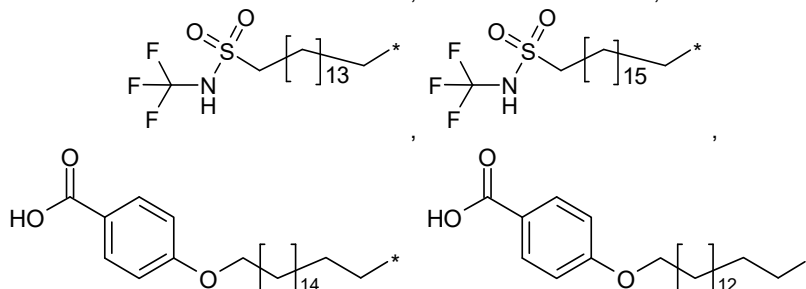
5



10



15



20

en donde * indica la unión al espaciador hidrofílico a través de un grupo químico que une el residuo de unión a la albúmina y el espaciador hidrofílico.

25

21. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-20 en donde el grupo químico que une el residuo de unión a la albúmina y el espaciador hidrofílico tiene la fórmula



30

en donde

Y es $-(CH_2)_7-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8 - o un enlace de valencia,

35

l_7 es 0-6,

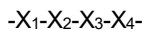
W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s_3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s_3 es 0 o 1,

40

W_8 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s_4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s_4 es 0 o 1.

45

22. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-21 en donde el espaciador hidrofílico tiene la fórmula



50

en donde

X_1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l_1}-W_2]_{m_1}-\{[(CH_2)_{n_1}E_1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}$,

X_2 es $-[(CHR^3)_{l_3}-W_4]_{m_4}-\{[(CH_2)_{n_3}E_2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}$,

55

X_3 es $-[(CHR^5)_{l_5}-W_6]_{m_7}$,

X_4 es $F-D_1-(CH_2)_{l_6}-D_2-$,

60

l_1 , l_2 , l_3 , l_4 , l_5 e l_6 se seleccionan independientemente de 0-16,

m_1 , m_3 , m_4 , m_6 y m_7 se seleccionan independientemente de 0-10,

m_2 y m_5 se seleccionan independientemente de 0-25,

65

n_1 , n_2 , n_3 y n_4 se seleccionan independientemente de 0-16,

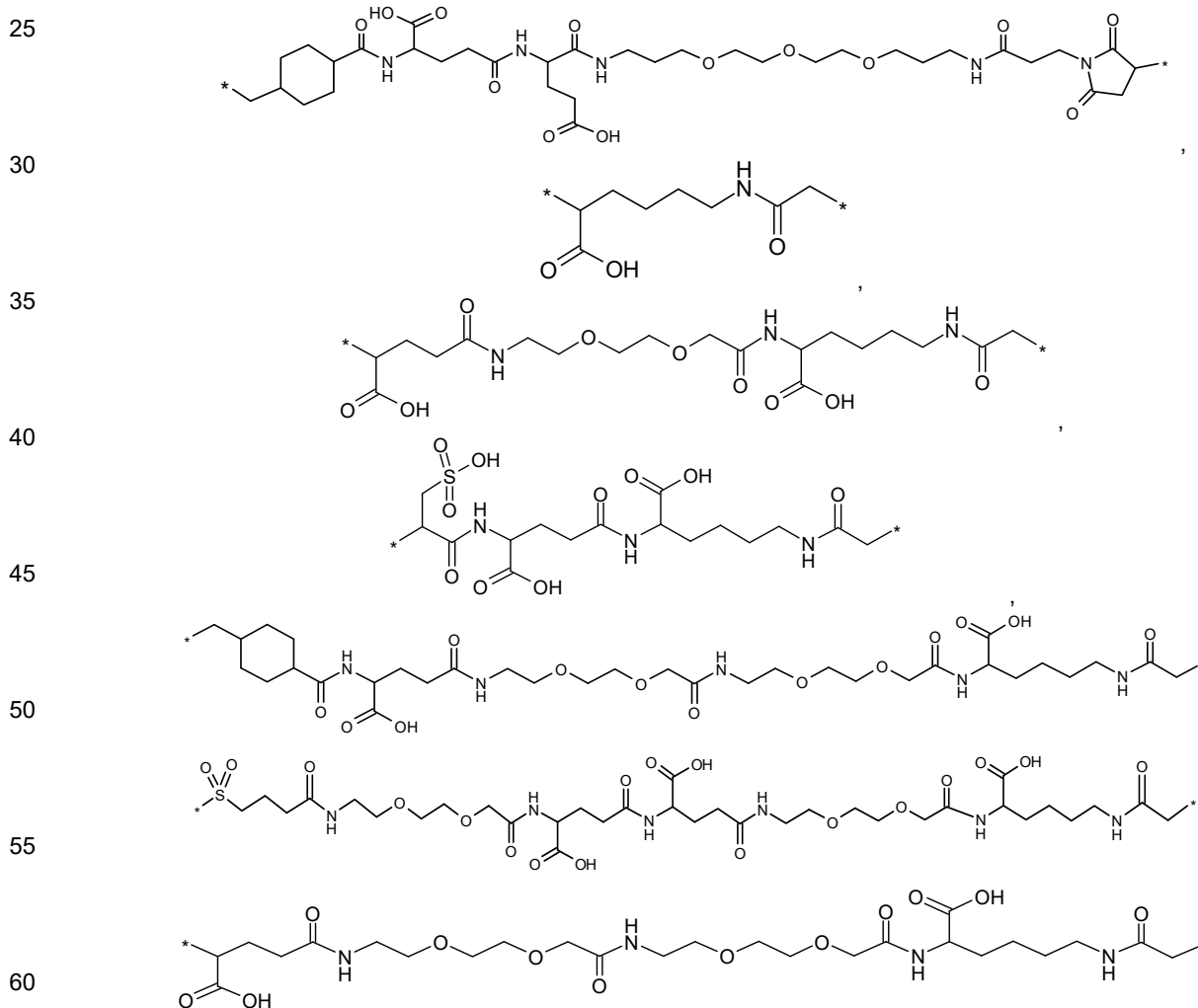
F es arilo, hetarilo, pirrolidin-2,5-diona o un enlace de valencia, en donde el arilo y grupos hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo,

5 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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

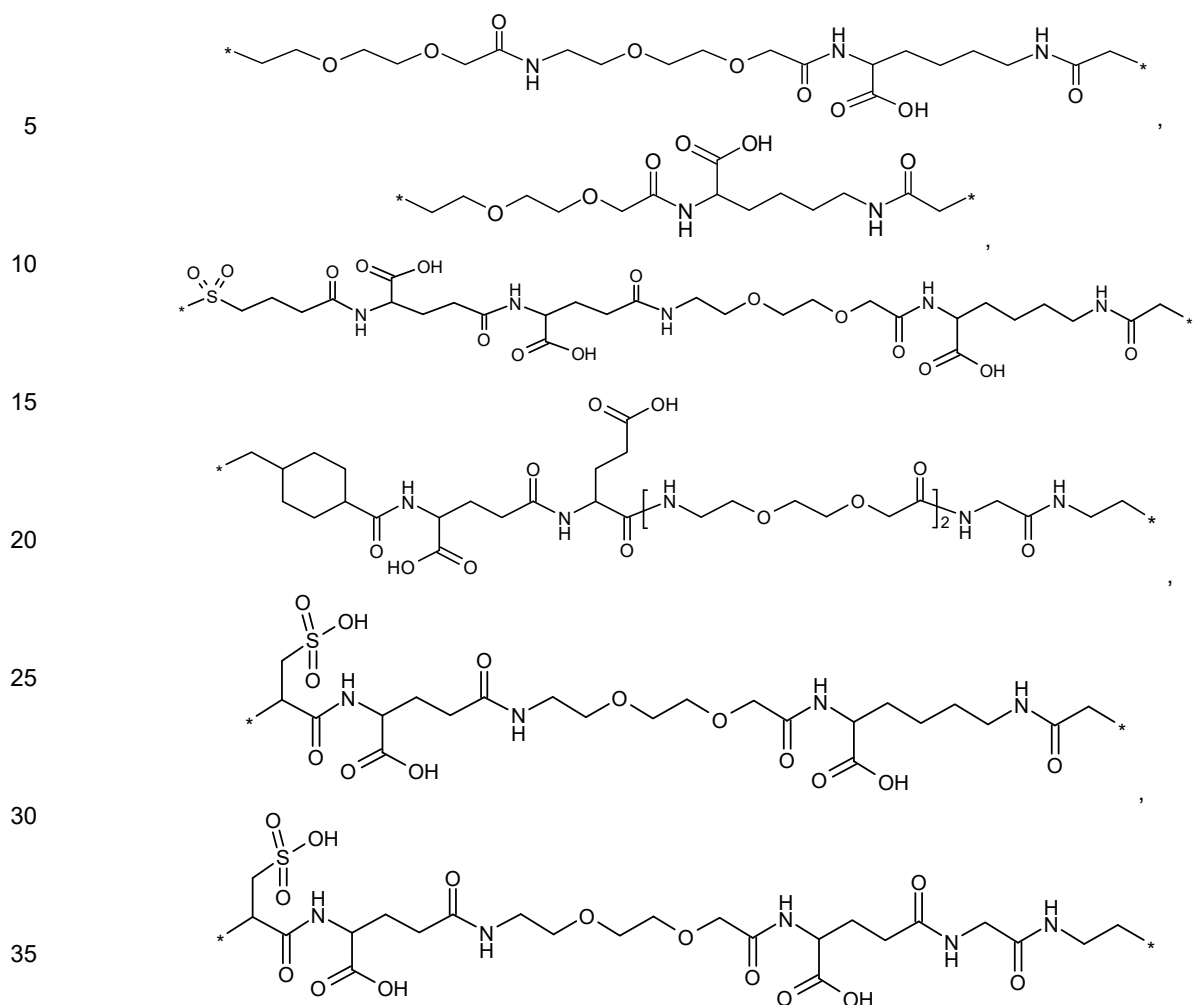
10 D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R⁶)-, -N(C)R⁷- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W₁ a W₅ se seleccionan independientemente de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -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, W₆ se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace de valencia; en donde s₁ es 0 o 1 y el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

20 23. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-22, en donde X₄ es un enlace de valencia y W₆ se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

24. El conjugado de la modalidad 22, en donde el espaciador hidrofílico se selecciona de



65



25. Un conjugado de la hormona de crecimiento en donde el conjugado de la hormona de crecimiento tiene la fórmula (I):



en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con una mutación única de Cys,

B representa un espaciador hidrofílico unido al residuo de azufre de la mutación de Cys,

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

A representa un residuo de unión a la albúmina; y

sales farmacéuticamente aceptables de este.

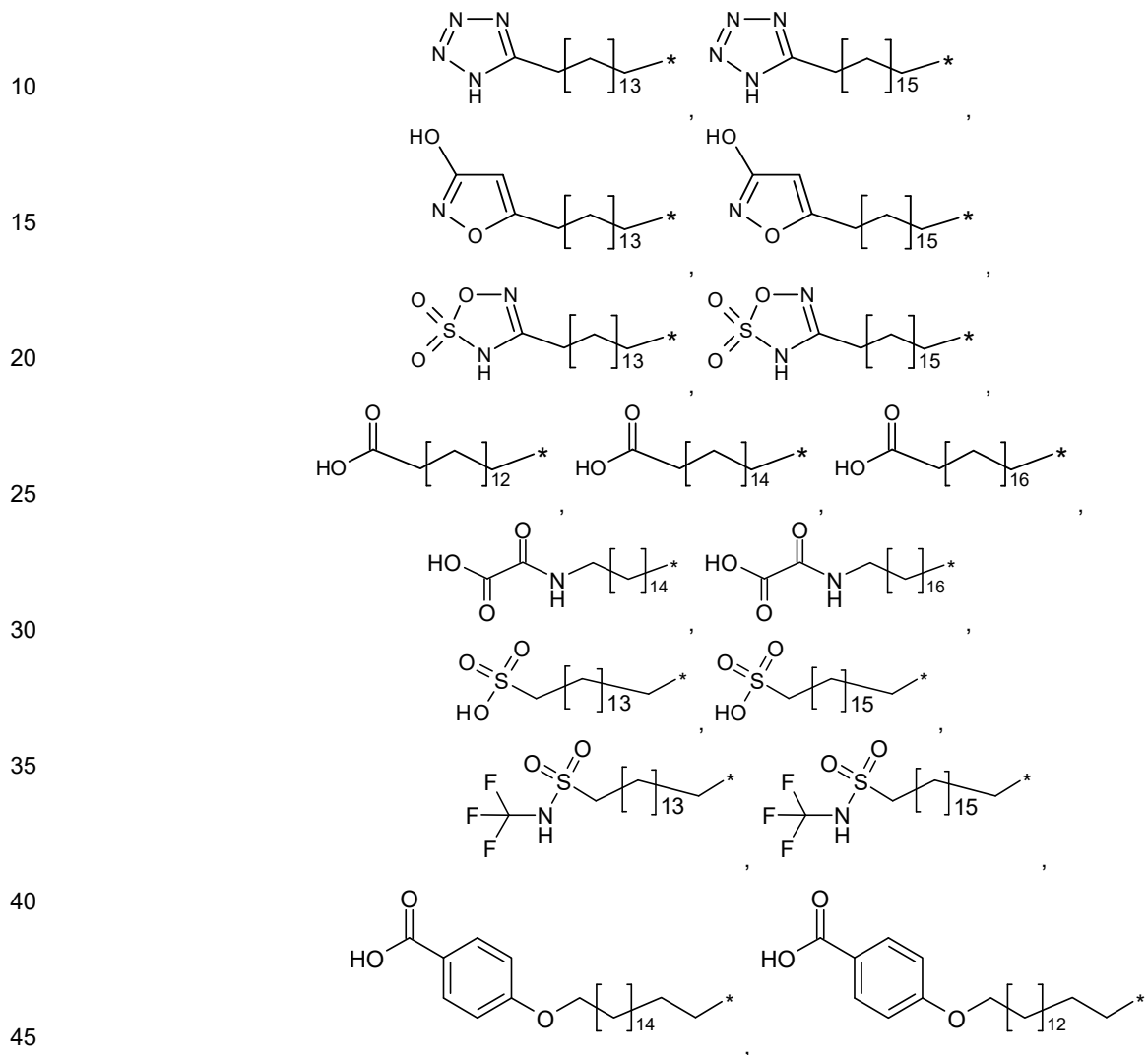
26. El conjugado de la modalidad 25, en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1), tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad con hGH, o GH es hGH (SEQ ID NO: 1).

27. El conjugado de la modalidad 25, en donde GH o el conjugado de GH tiene al menos 80 % de la actividad de la hormona del crecimiento de hGH.

28. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-27, en donde la mutación única de Cys se ubica en cualquiera de las regiones seleccionadas del N-terminal, H1, H2, L2 o H3 de GH.

29. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-28 en donde la GH tiene una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C.

5 30. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-29, en donde A se selecciona de



en donde * indica la unión a B a través de W.

50 31. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-30, en donde W tiene la fórmula



en donde

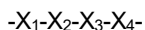
55 Y es $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8 - o un enlace de valencia,

17 es 0-6,

60 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 s_3 es 0 o 1,

65 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 s_4 es 0 o 1.

32. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-31 en donde B tiene la fórmula



5 en donde

X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l_1}-W_2]_{m_1}-\{[(CH_2)_{n_1}E1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}-$

X2 es $-[(CHR^3)_{l_3}-W_4]_{m_4}-\{[(CH_2)_{n_3}E2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}-$

10

X3 es $-[(CHR^5)_{l_5}-W_6]_{m_7}-$

X4 es $F-D1-(CH_2)_{l_6}-D2-$

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

20 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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

25

D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R⁶)-, -N(C)R⁷- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W₁ a W₅ 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,

30

W₆ se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde s1 es 0 o 1 y el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

35

33. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-32, en donde

40

I1, I2, I3, I4, I5 e I6 son independientemente 0-6,

m1, m3, m4, m6 y m7 son independientemente 0-6,

45

m2 y m5 son independientemente 0-10, y

n1, n2, n3 y n4 son independientemente 0-10,

34. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-33, en donde D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

50

35. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-34, en donde E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

36. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-35, en donde W1 a W8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

55

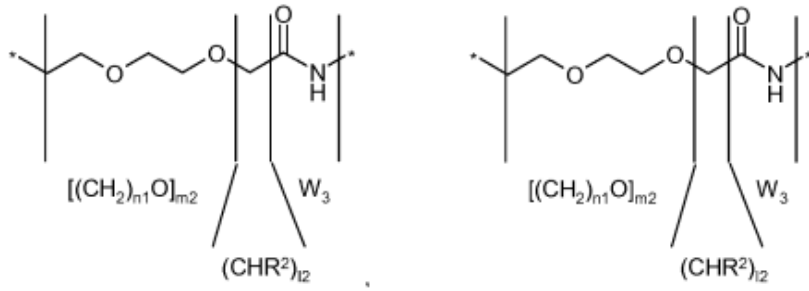
37. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-36, en donde R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂ o -S(O)₂OH.

60

38. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-37, en donde $\{[(CH_2)_{n_1}E1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}-$ y $\{[(CH_2)_{n_3}E2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}-$, en donde E1 y E2 son -O-, se seleccionan de

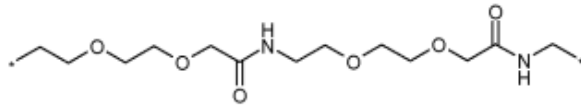
65

5

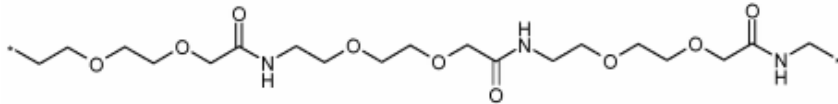


10

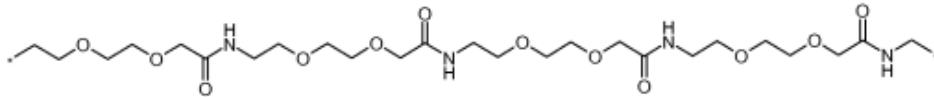
15



20



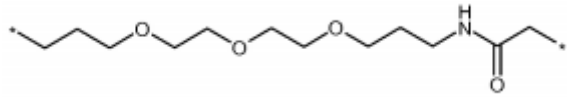
25



30

, y

35



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

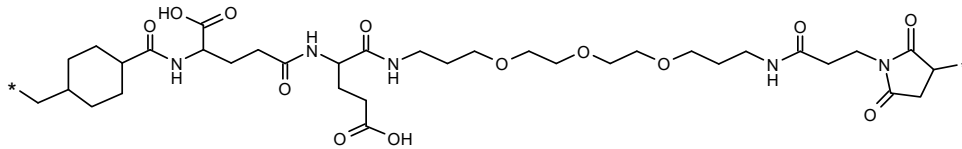
40

39. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-38, en donde X₄ es un enlace de valencia y W₆ se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

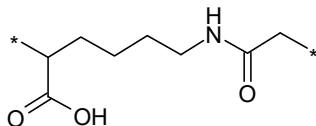
45

40. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-39, en donde B se selecciona de

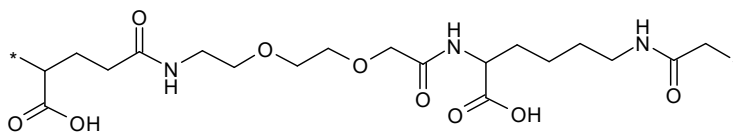
50



55

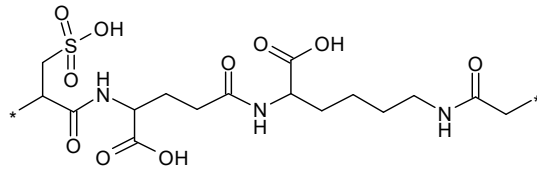


60

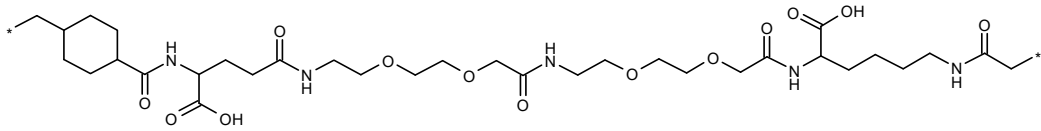


65

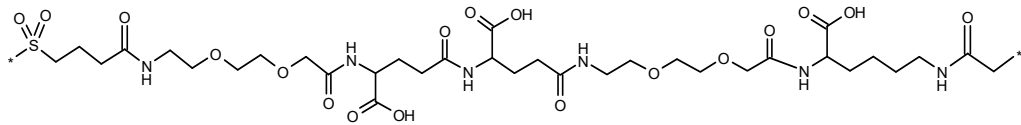
5



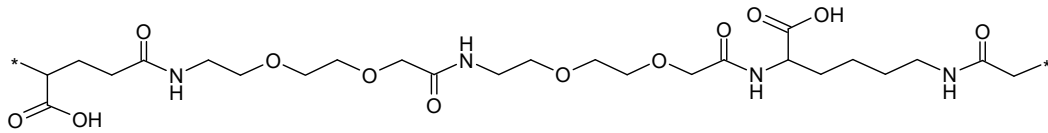
10



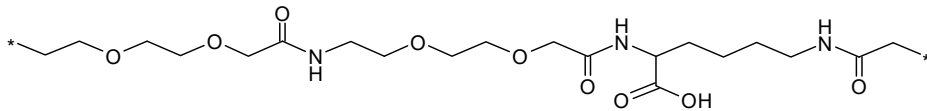
15



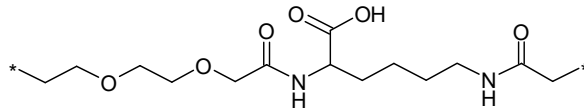
20



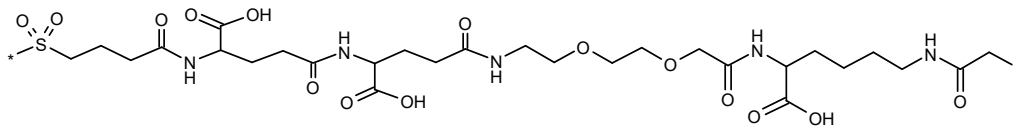
25



30

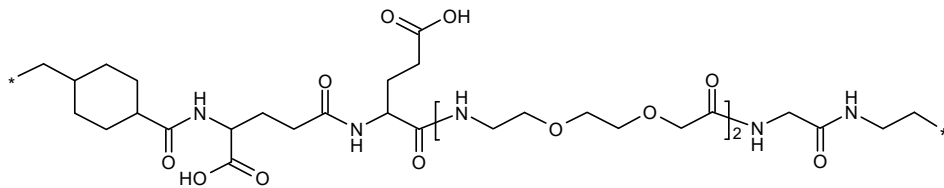


35



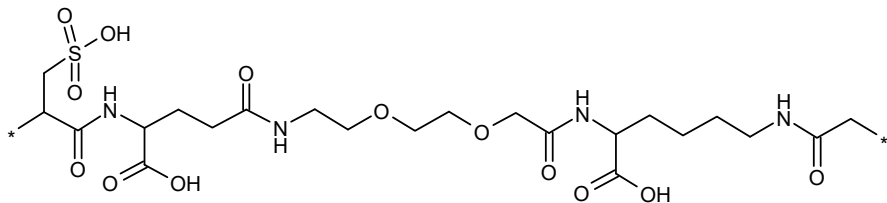
40

45

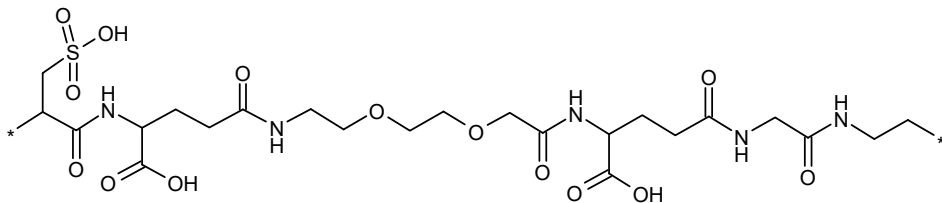


50

55

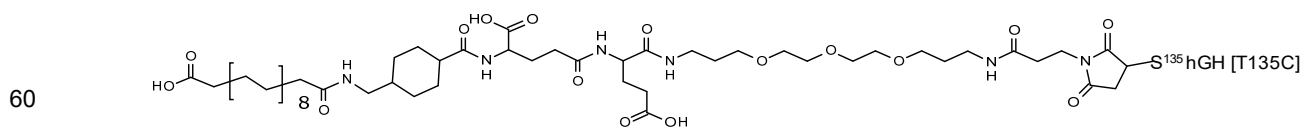
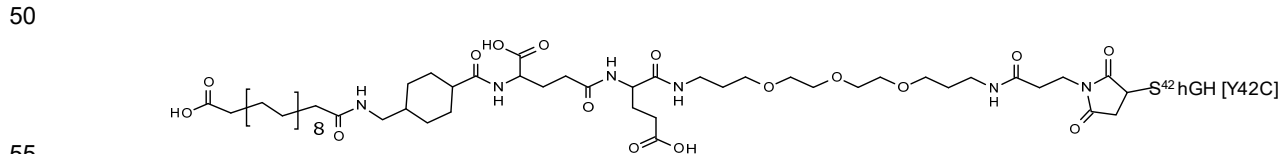
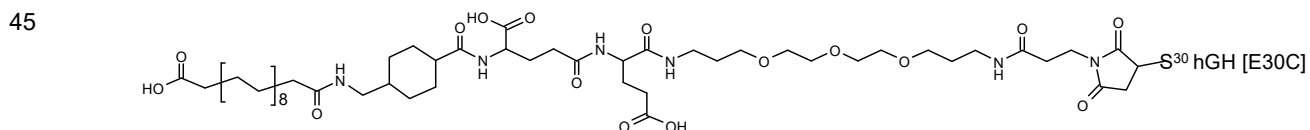
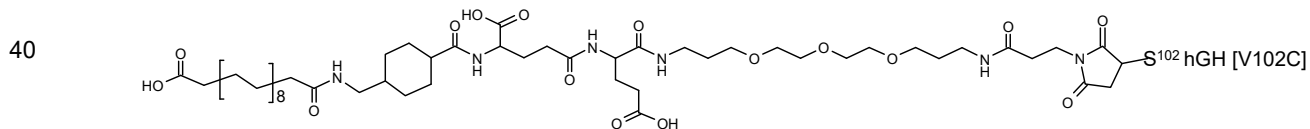
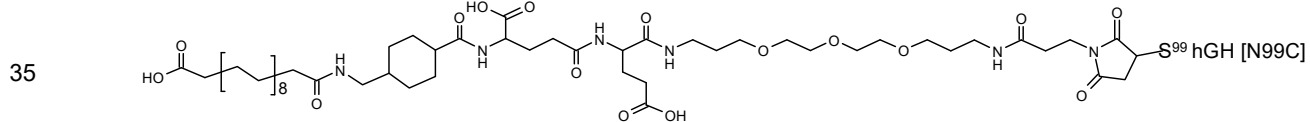
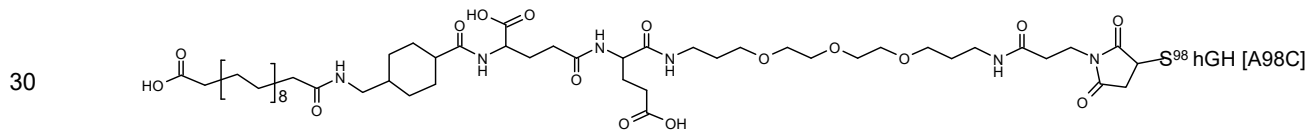
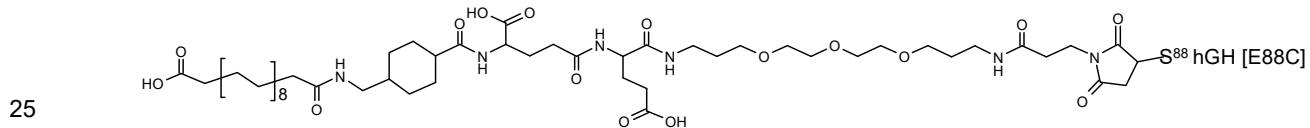
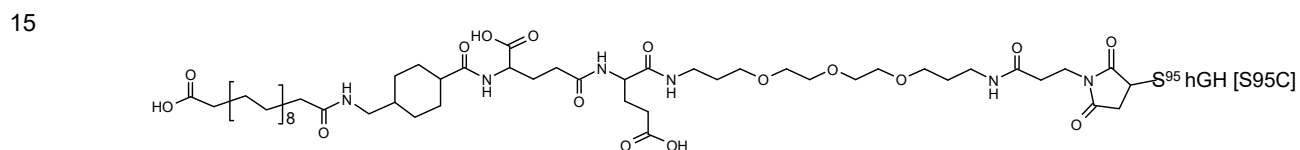
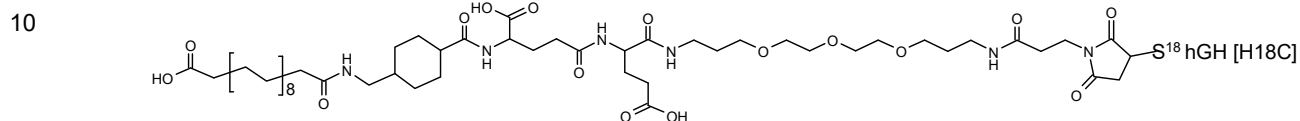
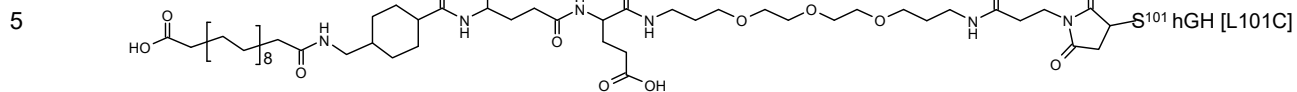


60



65

41. El conjugado de cualquiera de las modalidades 25-40, en donde dicho compuesto se selecciona de



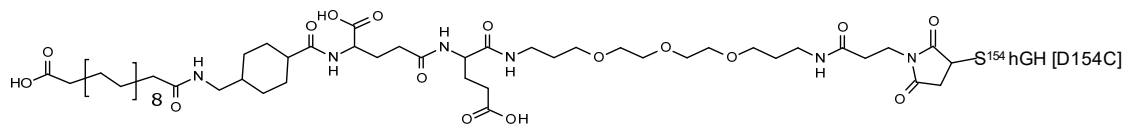
55

60

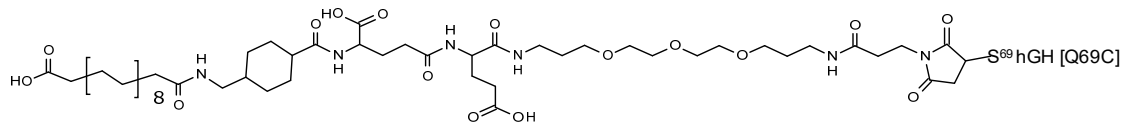
65

ES 2 745 484 T3

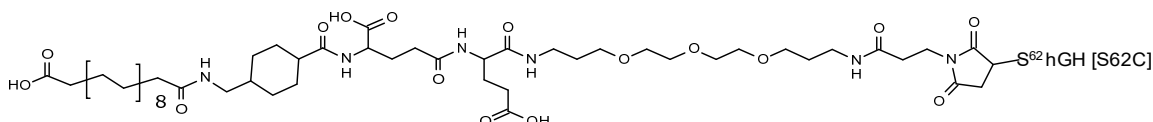
5



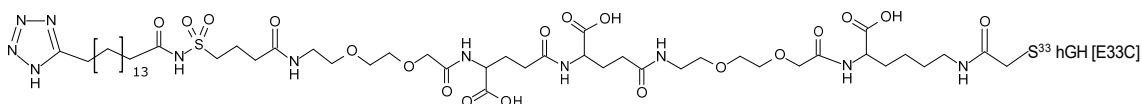
10



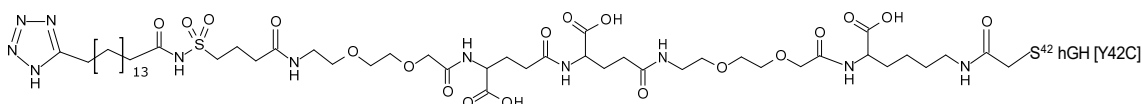
15



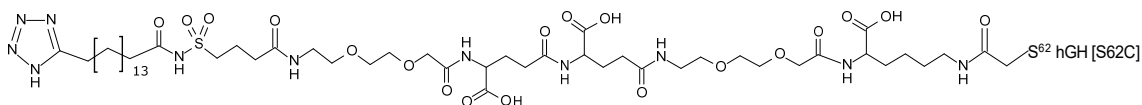
20



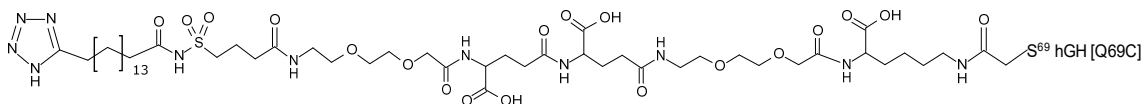
25



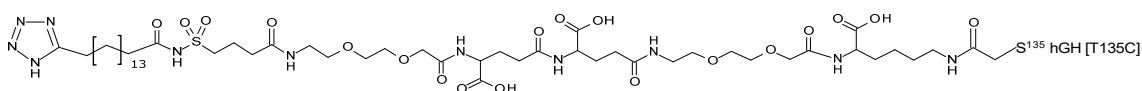
30



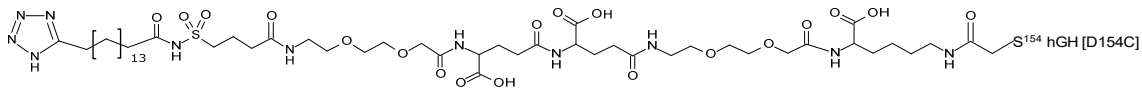
35



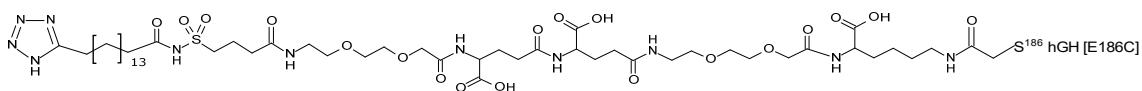
40



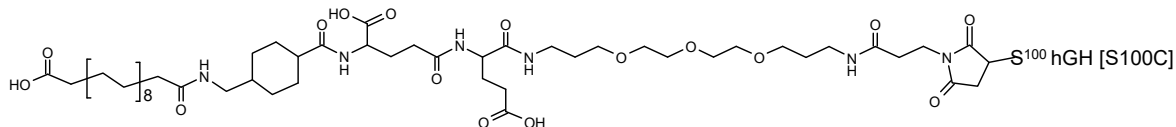
45



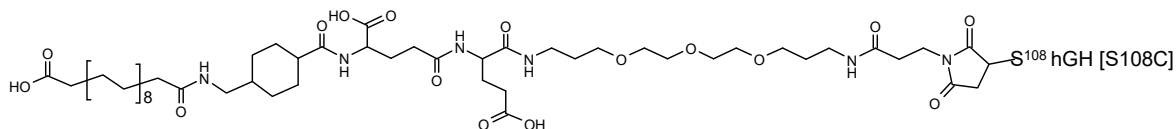
50



55

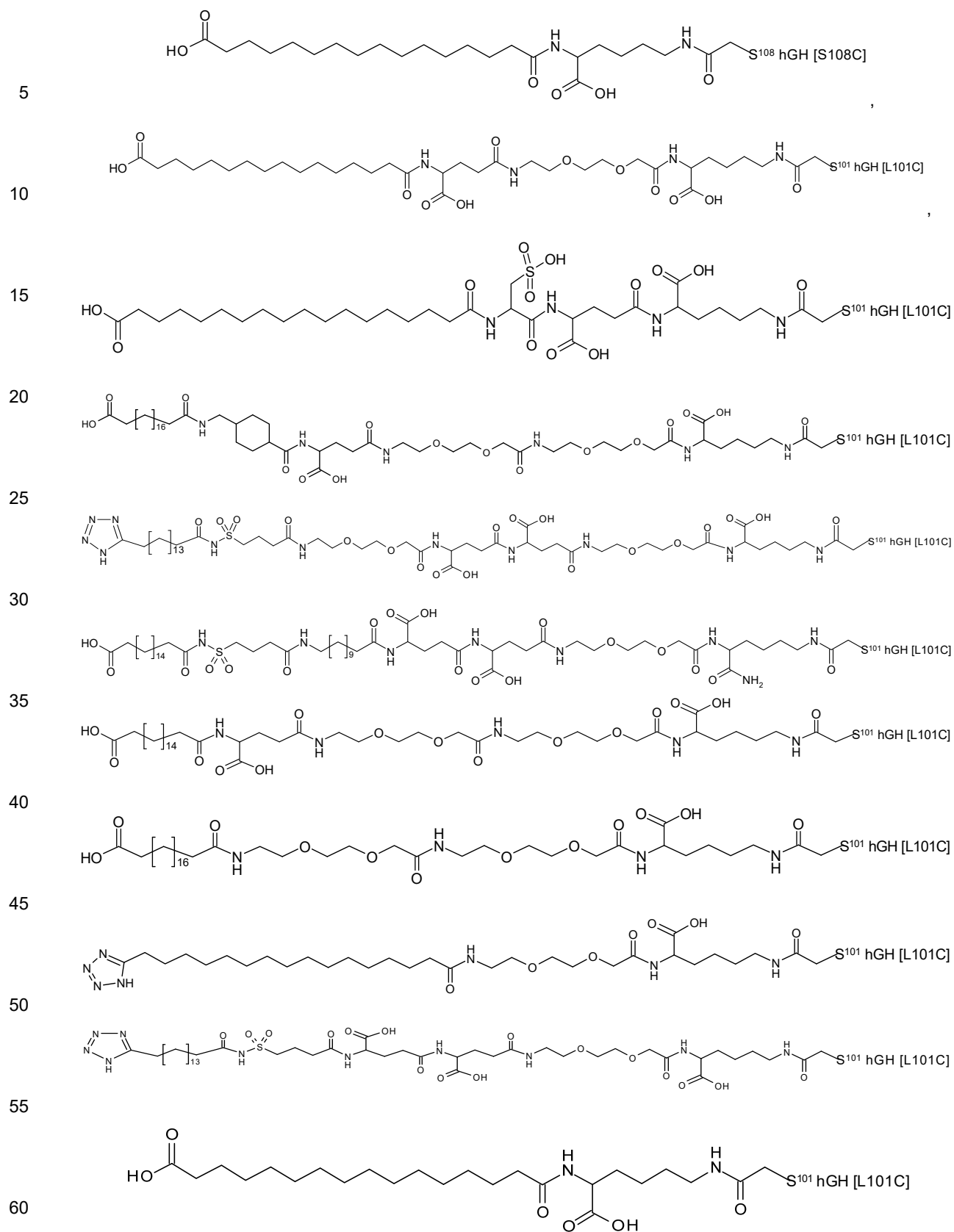


60



65

ES 2 745 484 T3



42. Un conjugado de la hormona de crecimiento en donde el conjugado de la hormona de crecimiento tiene la fórmula (I):



5 en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con un puente disulfuro adicional,

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

15

sales farmacéuticamente aceptables de este.

43. El conjugado de la modalidad 42, en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1), tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad con hGH, o GH es hGH (SEQ ID NO: 1).

20

44. El conjugado de la modalidad 42, en donde GH o los conjugados de GH tiene al menos 80 % de la actividad de la hormona del crecimiento de hGH.

25

45. El conjugado de la modalidad 44, en donde la actividad se mide en un ensayo *in vitro* BAF (ensayo I)

46. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-45, en donde la GH comprende enlaces disulfuro adicionales entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre segmentos helicoidales.

30

47. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-46, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

35

48. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-47, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, con un segmento helicoidal, tal como la hélice B o hélice 2.

40

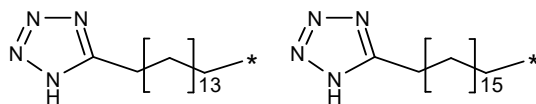
49. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-48, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde el enlace disulfuro adicional conecta L3 (128-154), con la hélice B o hélice 2.

50. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-49, en donde el puente disulfuro adicional está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

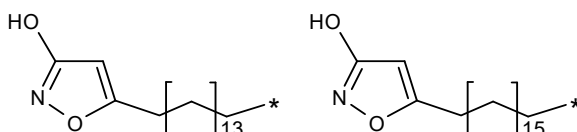
45

50 51. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-50, en donde A se selecciona de

55

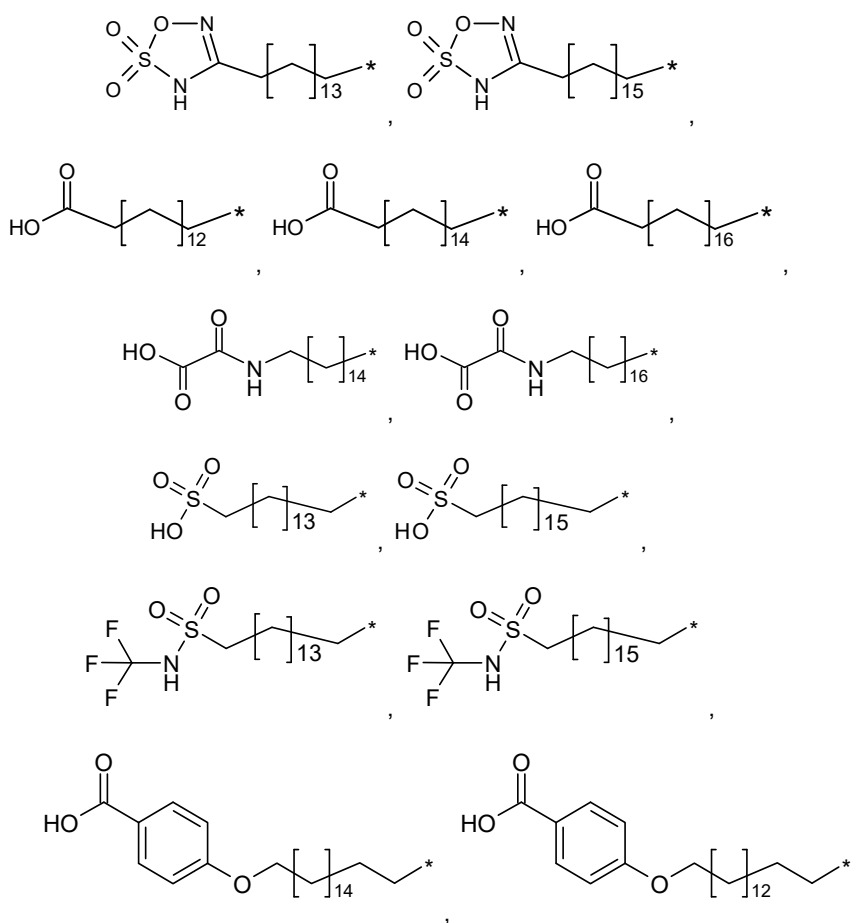


60



65

5
10
15
20
25
30
35



en donde * indica la unión a B a través de W.

52. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-51, en donde W tiene la fórmula

40



en donde

45

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

17 es 0-6,

50

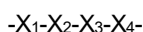
W_7 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s_3 es 0 o 1,

55

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 s_4 es 0 o 1.

53. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-52 en donde B tiene la fórmula

60



en donde

X_1 es $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 es $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 es $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$,

X4 es F-D1-(CH₂)₆-D2-,

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

5 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,

10 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,

15 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 se sustituyen opcionalmente con halógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN o -OH,

20 D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R⁶)-, -N(C)R⁷- o un enlace de valencia; en donde R⁶ y R⁷ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W₁ a W₅ 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,

25 W₆ se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde s1 es 0 o 1 y el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

30 54. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-53, en donde

I1, I2, I3, I4, I5 e I6 son independientemente 0-6,

35 m1, m3, m4, m6 y m7 son independientemente 0-6,
m2 y m5 son independientemente 0-10, y

n1, n2, n3 y n4 son independientemente 0-10,

40 55. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-54, en donde D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

56. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-55, en donde E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

45 57. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-56, en donde W1 a W8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo o -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

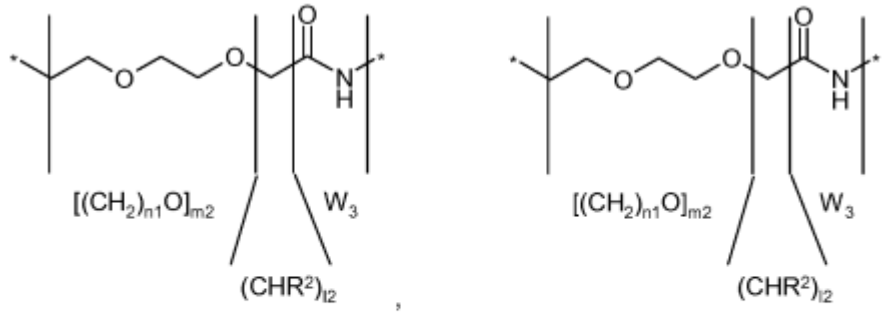
50 58. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-57, en donde R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH o C₁₋₆-alquilo; en donde el grupo alquilo se sustituye opcionalmente con -C(O)OH, -C(O)NH₂ o -S(O)₂OH.

55 59. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-58, en donde -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W3]_{m3}]_{n2}- y -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{l4}-W5]_{m6}]_{n4}-, en donde E1 y E2 son -O-, se seleccionan de

60

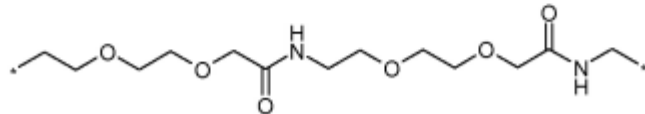
65

5

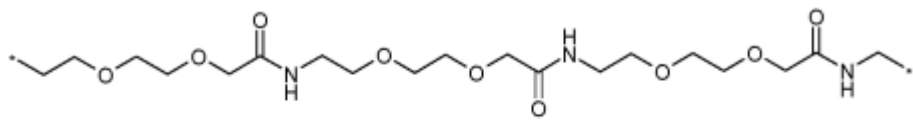


10

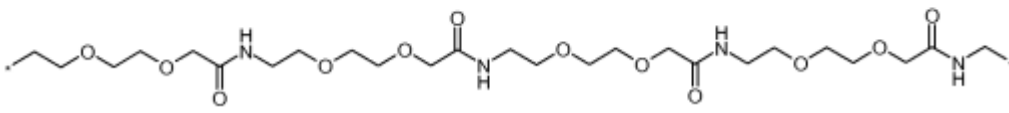
15



20



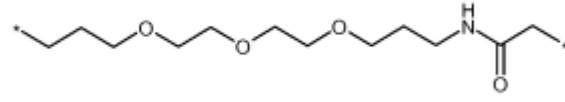
25



30

y

35

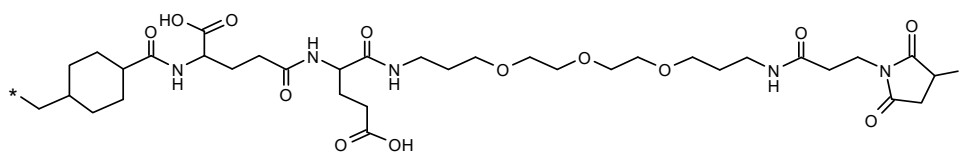


40

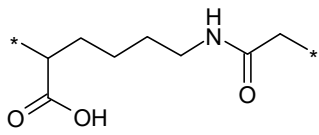
en donde * se entiende que denota un punto de unión, es decir, un enlace abierto.

60. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-59, en donde B se selecciona de

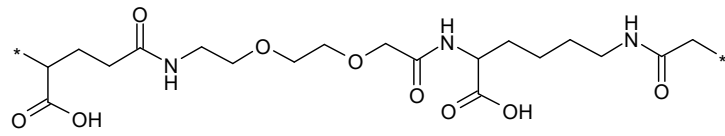
45



50



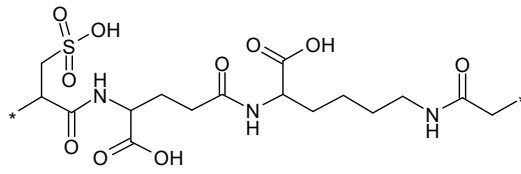
55



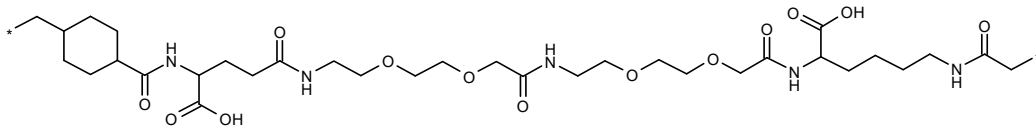
60

65

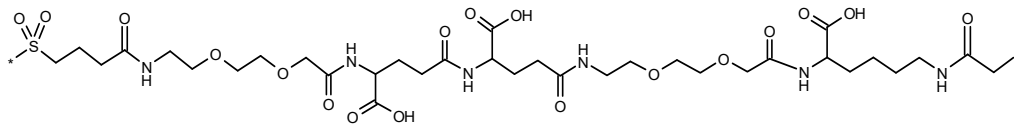
5



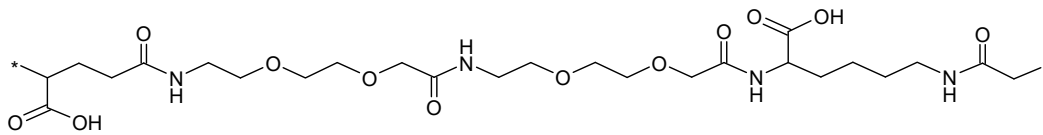
10



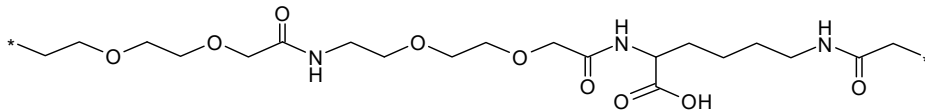
15



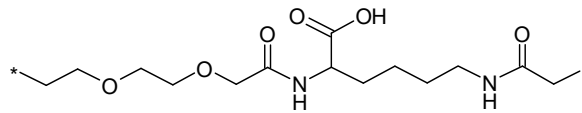
20



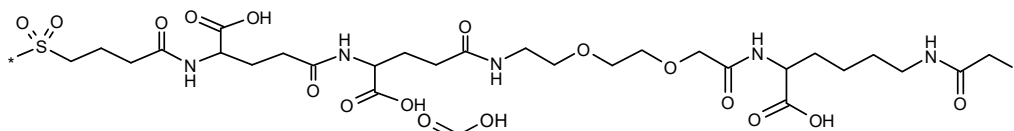
25



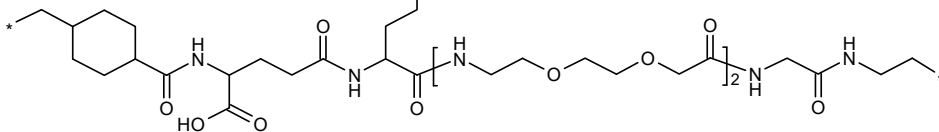
30



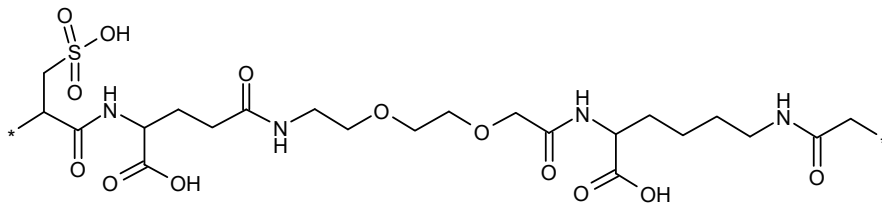
35



40



45

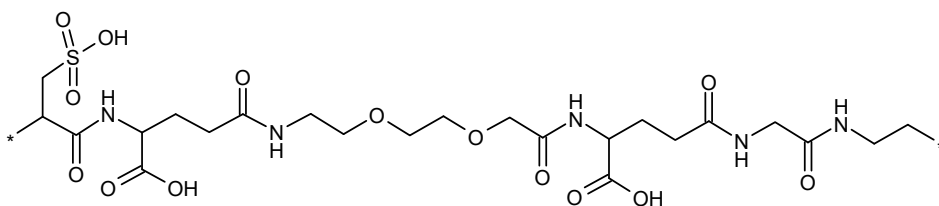


50

55

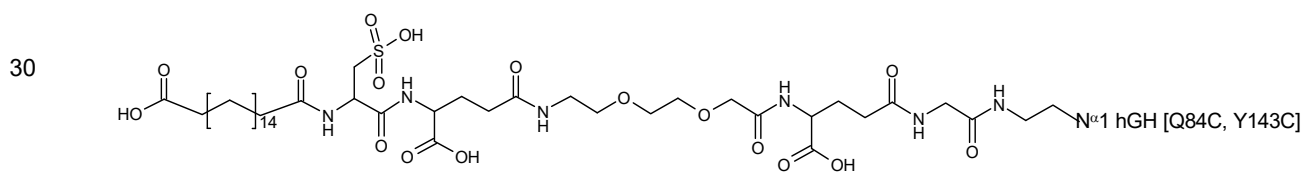
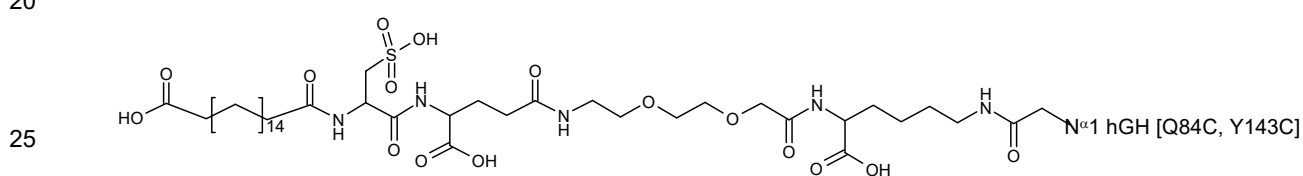
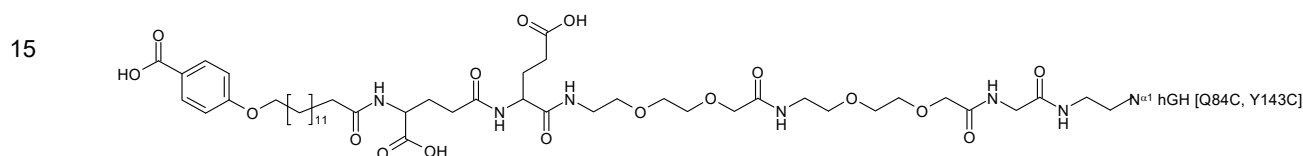
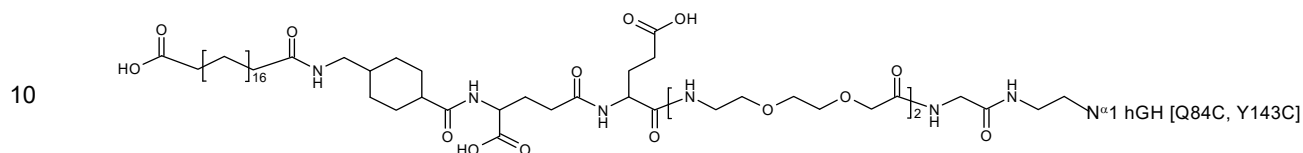
60

65



61. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-60, en donde A a través de B se une al residuo de glutamina en la posición correspondiente a la posición 40, posición 141 en hGH SEQ ID NO: 1, o el residuo N-terminal del compuesto de la hormona de crecimiento.

5 62. El conjugado de cualquiera de las modalidades 42-61, en donde dicho compuesto se selecciona de



30 63. Un conjugado de la hormona de crecimiento en donde el conjugado de la hormona de crecimiento tiene la fórmula (I):



40 en donde

GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento con una mutación única de Cys y un puente disulfuro adicional,

45 B representa un espaciador hidrofílico unido al residuo de azufre de la mutación de Cys,

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

50 A representa un residuo de unión a la albúmina; y sales farmacéuticamente aceptables de este.

64. El conjugado de la modalidad 63, en donde GH representa un compuesto de hormona de crecimiento que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 1), tal como al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad con hGH, o GH es hGH (SEQ ID NO: 1).

65. El conjugado de la modalidad 64, en donde GH o el conjugado de GH tiene al menos 80 % de la actividad de la hormona del crecimiento de hGH.

60 66. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-65, en donde la mutación única de Cys se ubica en cualquiera de las regiones seleccionadas del extremo N-terminal, H1, H2, L2 o H3 de GH.

65 67. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-66 en donde la GH tiene una mutación única de Cys seleccionada de cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C,

S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C, tal como cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C

5 68. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-67, en donde el enlace disulfuro adicional está entre un segmento bucle y un segmento helicoidal o dentro del segmento bucle o entre los segmentos bucle o entre los segmentos helicoidales.

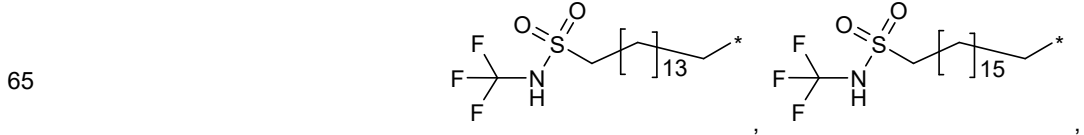
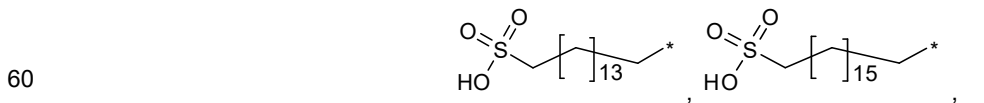
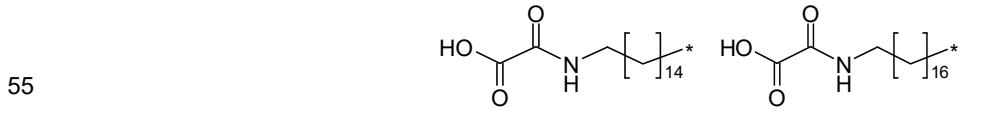
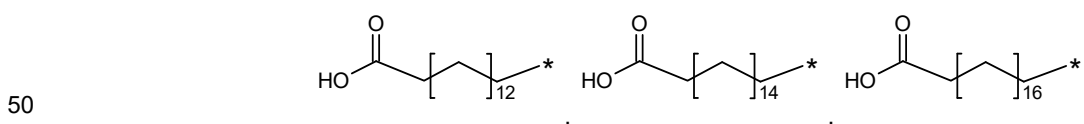
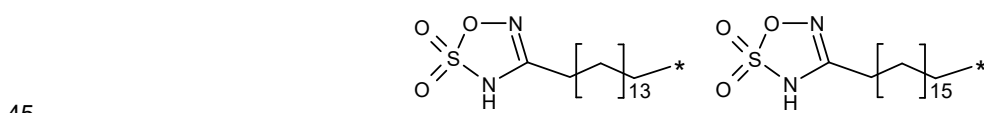
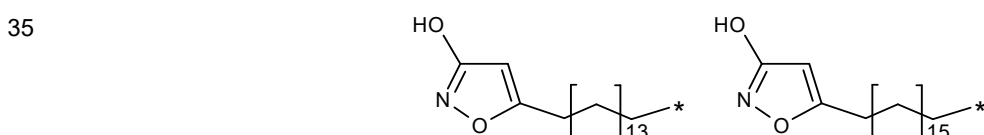
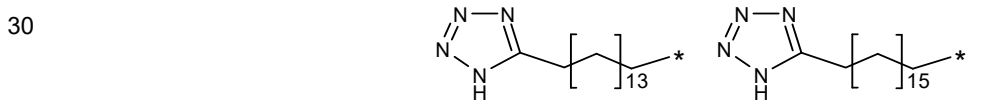
10 69. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-68, en donde la GH comprende un enlace disulfuro adicional en donde al menos una de las cisteínas está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).

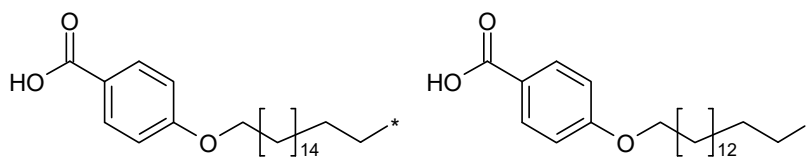
15 70. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-69, en donde el enlace disulfuro adicional conecta un segmento bucle, con un segmento helicoidal, tal como H2.

15 71. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-70, en donde el enlace disulfuro adicional conecta L3, con la hélice H2.

20 72. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-71, en donde el puente disulfuro adicional está entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

73. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-72, en donde A se selecciona de





en donde * indica la unión a B a través de W.

74. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-73, en donde W tiene la fórmula



en donde

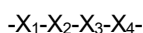
Y es $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8- o un enlace de valencia,

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 s_3 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 s_4 es 0 o 1.

75. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-74 en donde B tiene la fórmula



en donde

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

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

l_1 , l_2 , l_3 , l_4 , l_5 e l_6 se seleccionan independientemente de 0-16,

m_1 , m_3 , m_4 , m_6 y m_7 se seleccionan independientemente de 0-10,

m_2 y m_5 se seleccionan independientemente de 0-25,

n_1 , n_2 , n_3 y n_4 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, $-CN$, $-OH$, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ o C_{1-6} -alquilo,

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

D_1 , D_2 , E_1 y E_2 se seleccionan independientemente de $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C)R^7-$ o un enlace de valencia; en donde R^6 y R^7 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo, W_1 a W_5 se seleccionan independientemente de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s_2 es 0 o 1,

W_6 se selecciona de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -alquilo, $-C(O)NHC_{1-6}$ -alquilo o un enlace de valencia; en donde s_1 es 0 o 1 y el grupo C_{1-6} -alquilo se sustituye

opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

76. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-75, en donde

I1, I2, I3, I4, I5 e I6 son independientemente 0-6,

m1, m3, m4, m6 y m7 son independientemente 0-6,

m2 y m5 son independientemente 0-10, y

n1, n2, n3 y n4 son independientemente 0-10,

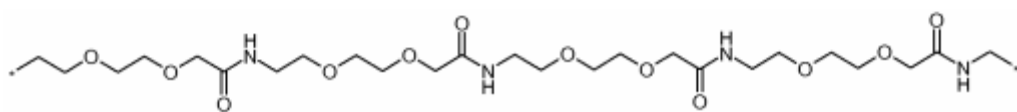
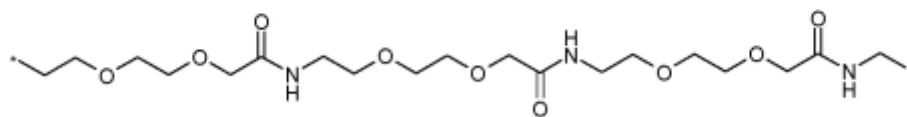
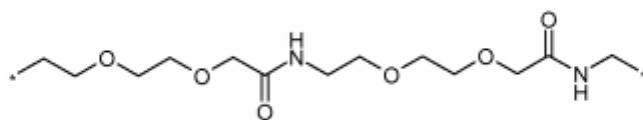
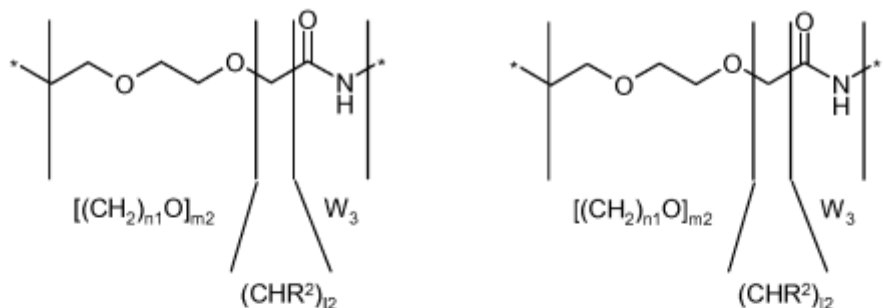
77. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-75, en donde D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

78. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-77, en donde E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

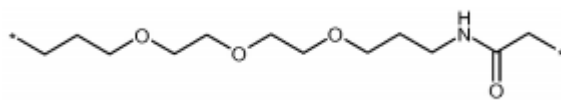
79. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-78, en donde W1 a W8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo o -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

80. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-79, en donde R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente 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 o -S(O)₂OH.

81. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-80, en donde -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}]_{n2}- y -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}]_{n4}-, en donde E1 y E2 son -O-, se seleccionan de



y



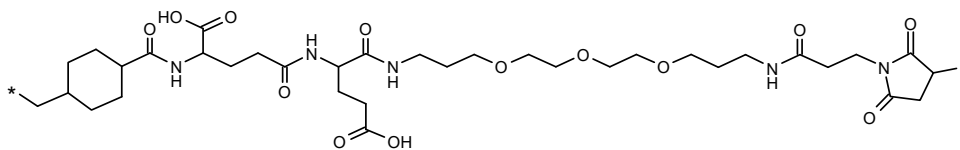
5

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

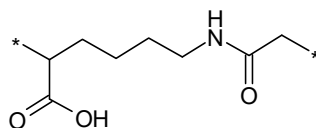
10

82. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-81, en donde X₄ es un enlace de valencia y W₆ se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

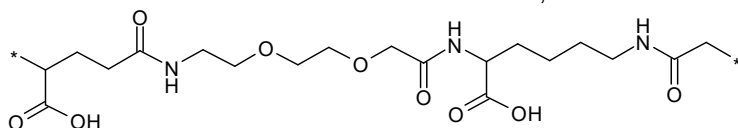
15



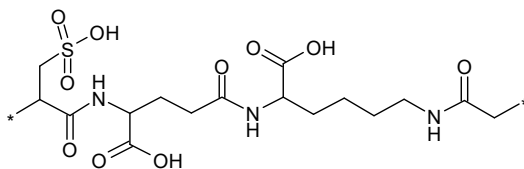
20



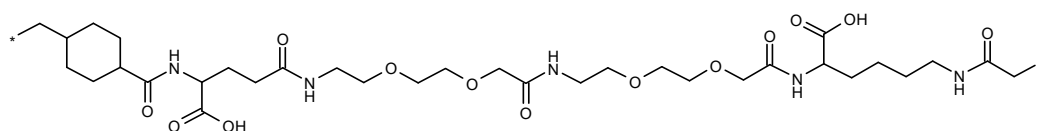
25



30

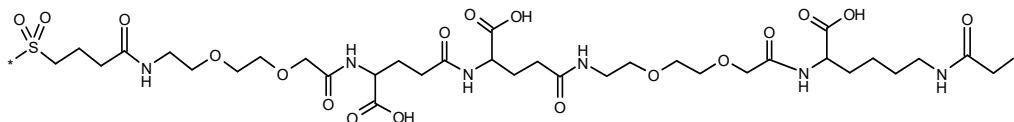


35

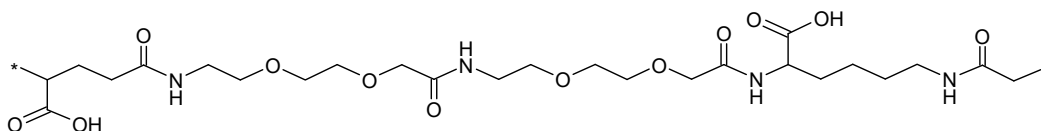


40

45

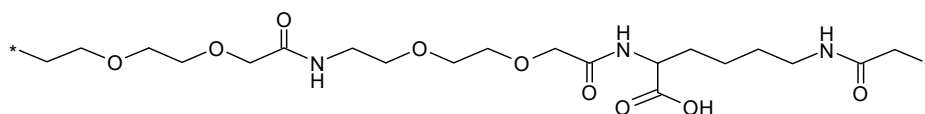


50



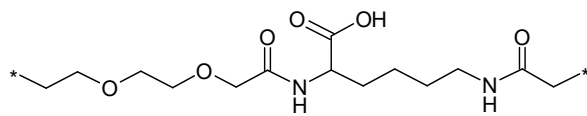
55

60

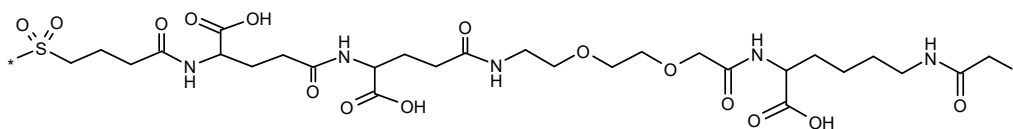


65

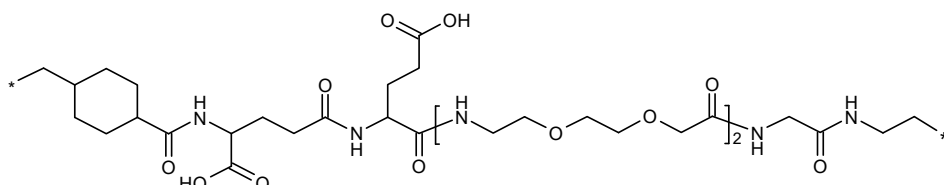
5



10

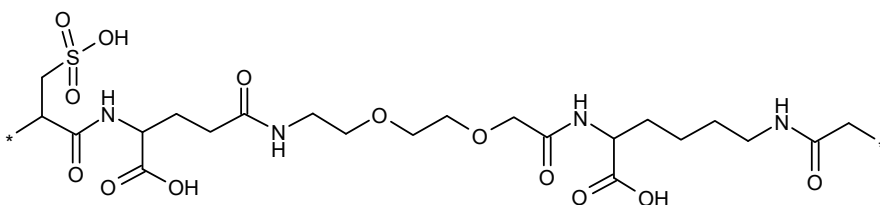


15

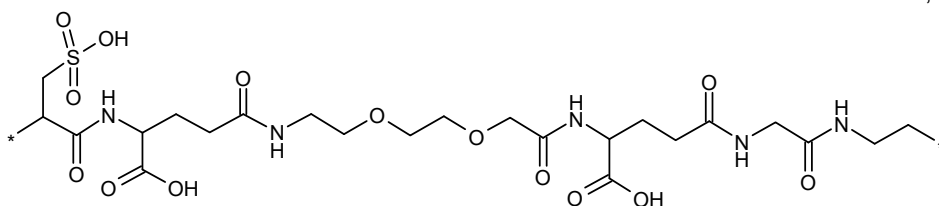


20

25



30



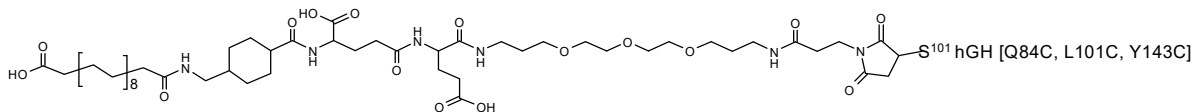
35

40

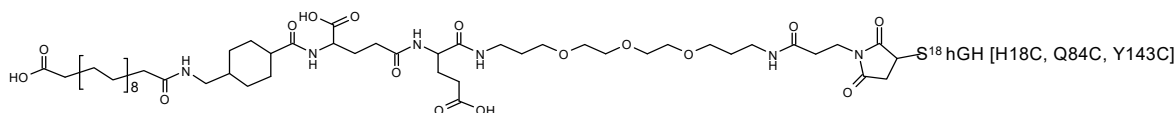
84. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-83 en donde un residuo de unión a la albúmina (A) a través de un espaciador hidrofílico (B) se une a dicho GH.

85. El conjugado de cualquiera de las modalidades 63-84, en donde dicho compuesto se selecciona de

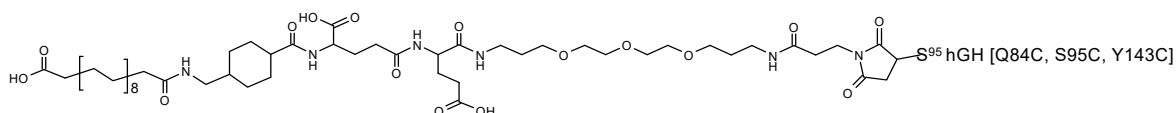
45



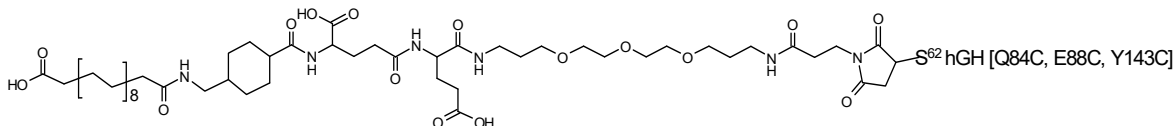
50



55

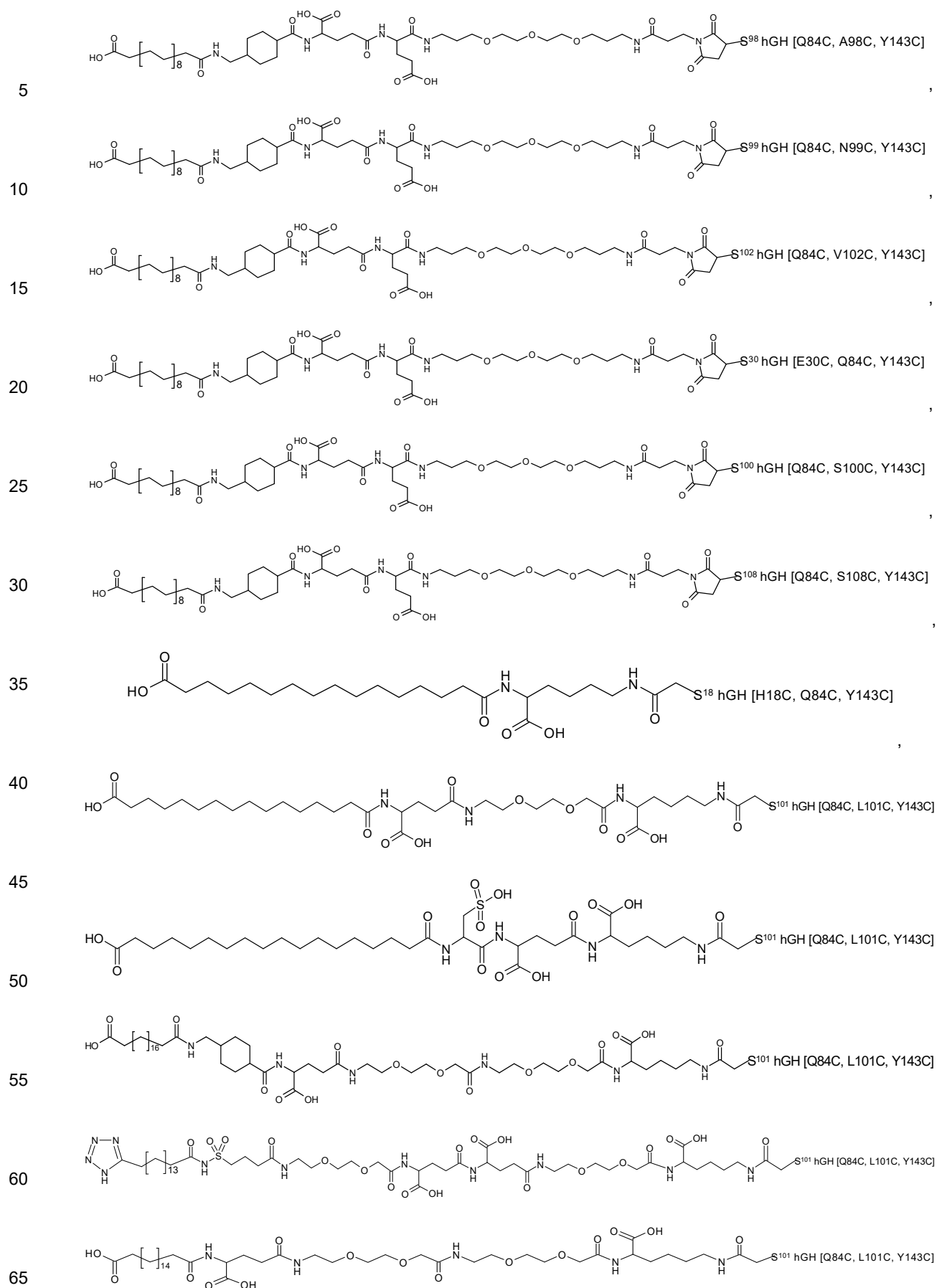


60

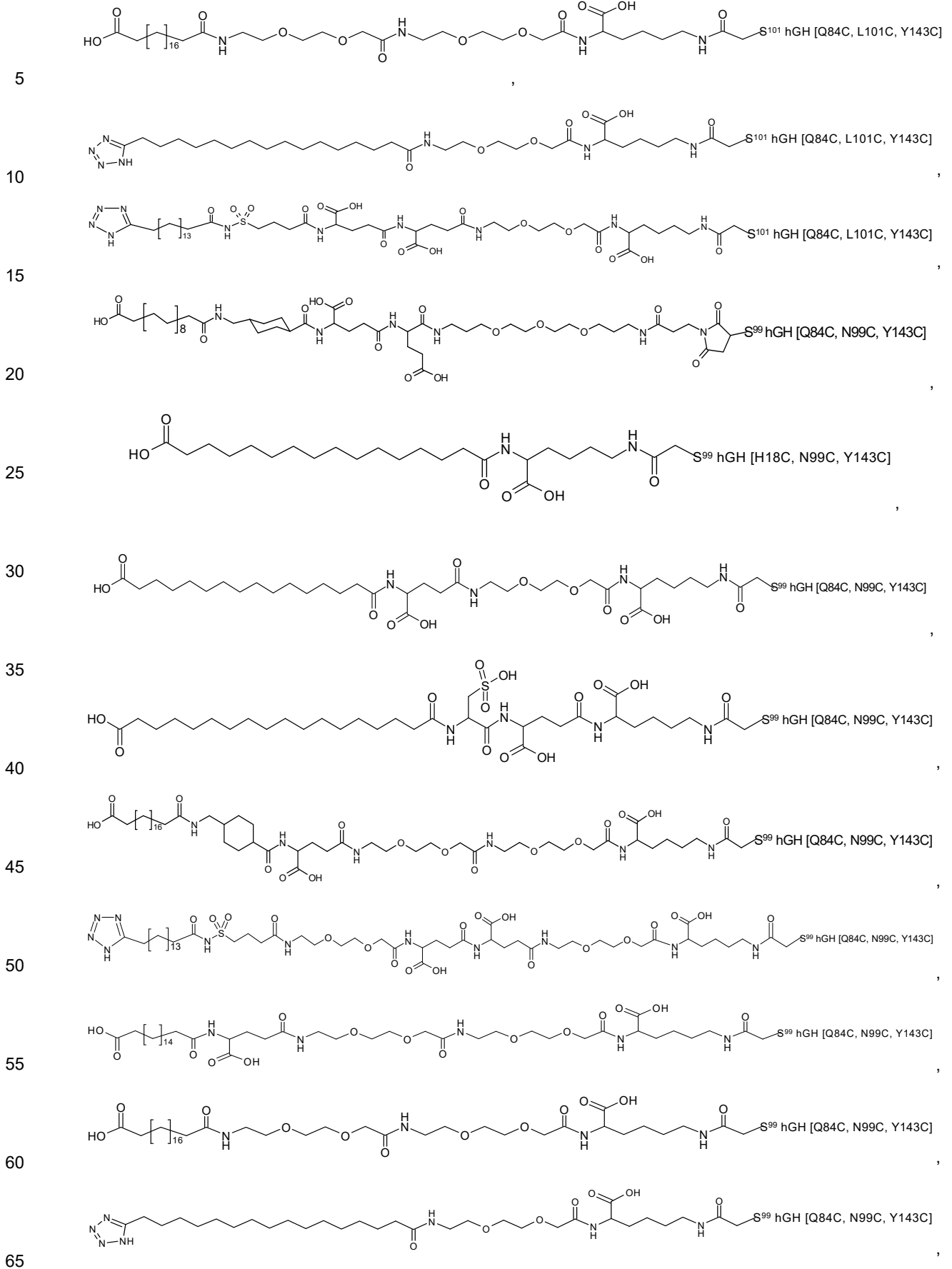


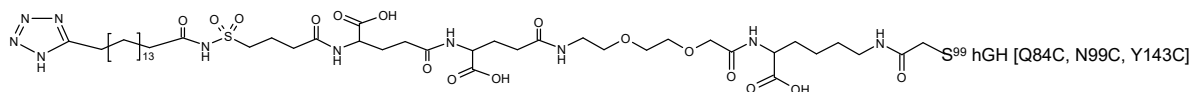
65

ES 2 745 484 T3



ES 2 745 484 T3





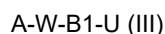
- 5 86. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-85 en donde el espaciador hidrofílico tiene $m\text{LogP} < 0$.
87. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-86, en donde el peso molar de dicho espaciador hidrofílico está en el intervalo de 80 D a 1500 D o en el intervalo de 300 D a 1100 D.
- 10 88. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-87, en donde dicho residuo de unión a la albúmina es un residuo lipofílico.
- 15 89. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-88, en donde dicho residuo de unión a la albúmina se une no covalentemente a la albúmina.
90. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-89, en donde dicho residuo de unión a la albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico.
- 20 91. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-90, 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 $10\ \mu\text{M}$ o por debajo de aproximadamente $1\ \mu\text{M}$.
- 25 92. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-91, 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.
- 30 93. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-92, 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.
94. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-93, en donde dicho residuo de unión a la albúmina es un péptido, tal como un péptido que comprende menos de 40 residuos de aminoácidos.
- 35 95. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-94, en donde dos residuos de unión a la albúmina (A) a través de un espaciador hidrofílico (B) se enlaza a dicho GH.
96. El conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95 para usar en la terapia.
- 40 97. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.
98. Una composición farmacéutica de la modalidad 97, en donde dicha composición puede administrarse por vía lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y en el intestino, nasal, pulmonar, epidérmica, dérmica, transdérmica, y parenteral a los pacientes.
- 45 99. Un método para tratar la deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD), el método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95.
- 50 100. 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, o la disminución de la velocidad de infección en el tejido dañado, el método que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95.

101. El uso de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95 en la producción de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD).

102. El uso de un conjugado de cualquiera de las modalidades 1-95 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 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.

103. Un compuesto de la fórmula (III)



en donde A representa un residuo de unión a la albúmina,

B1 representa un espaciador hidrofílico,

W es un grupo químico que une A y B1, y U representa un resto conjugado.

104. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103, en donde A y W son como se define en cualquiera de las modalidades anteriores.

105. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende o consiste en un arilo, un heteroarilo, una malimida sustituida o una pirrolidina-2,5-diona tal como $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-pirrolidin-2.5-diona}$.

106. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende $\text{D1}-(\text{CH}_2)_6\text{-D2}$, en donde D1 y D2 se seleccionan independientemente de $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_6)-$, $-\text{NC}(\text{O})\text{R}_7-$ o un enlace valencia; en donde R6 y R7 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo.

107. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende o consiste en un grupo saliente, tal como Cl, Br, I, $-\text{OH}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{Me}$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{CF}_3$, $-\text{Ots}$.

108. El compuesto de acuerdo con la modalidad 107, en donde el grupo saliente es una compuesto de halógeno que se selecciona de Cl, Br y I, preferentemente Br.

109. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende o consiste en una alilamina ($H_2C=CH-CH_2-NH_2$), tal como $-C(O)NHCH_2-CH=CH_2$.

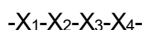
5 110. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende o consiste en una amina, tal como $-NH_2$.

111. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 103-110, en donde el compuesto terapéutico es un polipéptido.

10 112. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 103-110, en donde el compuesto terapéutico es un polipéptido con una única cisteína libre.

15 113. El compuesto de acuerdo con la modalidad 103 o la modalidad 104, en donde U comprende o consiste en un aldehído, tal como $-CHO$.

114. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 103-113, en donde el espaciador hidrofílico B1 tiene la fórmula



20 en donde

X1 es $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$,

25 X2 es $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$,

X3 es $-[(CHR^5)_{l5}]_{m7}$,

X4 es un enlace de valencia,

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

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

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

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

40 R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C₁₋₆-alquilo, arilo o hetarilo; en donde los grupos alquilo, arilo y hetarilo se sustituyen opcionalmente con halógeno, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ o $-OH$,

45 E1 y E2 se seleccionan independientemente de $-O-$, $-N(R_6)-$, $-N(C(O)R_7)-$ o un enlace de valencia; en donde R6 y R7 representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo,

W1 a W5 se seleccionan independientemente de $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, o un enlace de valencia; en donde s2 es 0 o 1.

50 EJEMPLOS

Abreviaturas:

amu = unidades de masa atómica

55 CV = volúmenes de columna

hr(s) = hora(s)

60 Hz = hertz

l = litro(s)

M = molar

65 mbar = milibar

	mg = miligramo(s)
	min. = minuto(s)
5	ml = mililitro(s)
	mM = milimolar
	mm = milímetro(s)
10	mmol = milimol(es)
	nmol = nanomol(es)
15	mol = mol(es)
	μL = microlitros
	N = normal
20	nm = nanómetro(s)
	seg = segundo(s)
25	ppm = partes por millón
	ESI = ionización por electrospray
	i.v. = vía intravenosa
30	m/z = relación de masa con relación a la carga
	MS = espectrometría de masas
35	HPLC = cromatografía líquida de alta presión
	RP = fase inversa
	HPLC-MS = cromatografía líquida de alta presión - espectrometría de masas
40	NMR = espectroscopía de resonancia magnética nuclear
	p.o. = por vía oral
45	rt o RT = temperatura ambiente
	s.c. = por vía subcutánea
	tr = tiempo de retención
50	Boc = terc butiloxicarbonilo
	O-t-Bu: éster terc butilo
55	<i>t</i> -Bu = terc <i>butilo</i>
	Boc-4-ABZ-OH = ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-benzoico
	DCM = diclorometano, CH ₂ Cl ₂ , metilencloruro
60	DIC = diisopropilcarbodiimida
	DIPEA = N,N-diisopropiletilamina
65	DMF = N,N-dimetilformamida
	DMSO = dimetilsulfóxido

DTT = ditioneitol

EDAC = hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

5 Et₂O = éter dietílico

EtOAc = acetato de etilo

Fmoc = 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo

10 Fmoc-Glu-O-t-Bu = éster N-Fmoc-ácido glutámico-1-t-butílico

Fmoc-Lys(Mtt)-OH = ácido (S)-6-[(difenil-p-tolil-metil)-amino]-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbo-

15 nilamino)-hexanoico

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

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

20 Fmoc-Thx-OH = ácido N-Fmoc-*trans*-4-aminometilciclohexancarboxílico

H₂O = agua

25 HOBt = 1-hidroxibenzotriazol

MeCN = acetonitrilo

MeOH = metanol

30 MTP = 3-metil-tio-1-propanol

NaCl = cloruro de sodio

35 NaOH = hidróxido de sodio

NMP = N-metilpirrolidin-2-ona

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

40 TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

45 TIS = triisopropilsilano

CDCl₃ = cloroformo deuterio

CD₃OD = metanol tetradeuterio

50 DMSO-d₆ = dimetilsulfóxido de hexadeuterio

TNBS = ácido trinitrobencenosulfónico

55 TSTU = tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio

Los ejemplos también utilizan los siguientes métodos generales:

Método general para preparar compuestos de hGH.

60 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.

65

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 horas. Las células se cosecharon finalmente mediante centrifugación.

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.

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.

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

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.

Ensayo para medir la velocidad 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 solución del compuesto de prueba a 1 mg/ml en tampón de bicarbonato de amonio se degrada por la enzima durante hasta 24 hrs a 37 °C. Las submuestras se toman a varios puntos de tiempo y la reacción proteolítica se detiene mediante la acidificación de la muestra por 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 2×150 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 $(A_T/A_0) \times 100$ %. 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.

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:

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.

5

RP-HPLC:

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 μ m (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.

10

LC-MS:

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 5 μ m 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 iones de spray de un espectrómetro de masa PE-Sciex API 100. El intervalo de masas 300 - 2000 amu se escaneó cada 2 segundos durante la corrida.

15

20

Cuantificación de la proteína:

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.

25

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

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.

30

35

SDS page:

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).

40

45

Cromatografía de proteínas:

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-Sefarosa 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

Prueba de TNBS

Se preparó una solución de DIPEA al 10 % en DMF (solución 1) y una solución de TNBS acuoso a 1 M (solución 2). Se colocaron algunas perlas de resina en un pequeño tubo de ensayo y se añadieron 1-3 gotas de cada solución (1 y 2). Después de una mezcla corta, la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 10 min y se inspeccionaron las perlas. Las perlas de color naranja intenso o rojo indican resultados positivos (es decir, la presencia de aminas libres); las perlas amarillas o ligeramente anaranjadas indican un resultado ligeramente positivo y las perlas incoloras son negativas.

55

60

Cálculo de LogP

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, 5175-5180, (1964) "A New

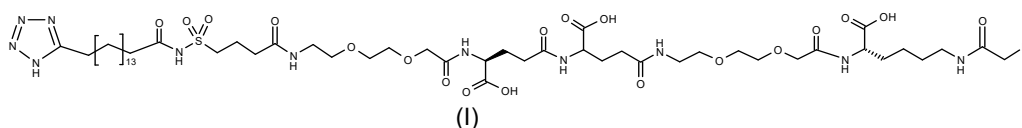
65

Substituent Constant, σ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski y otros. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25 (1997), "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 partición 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/>).

Preparación de grupos de unión a albúmina

Ejemplo 1

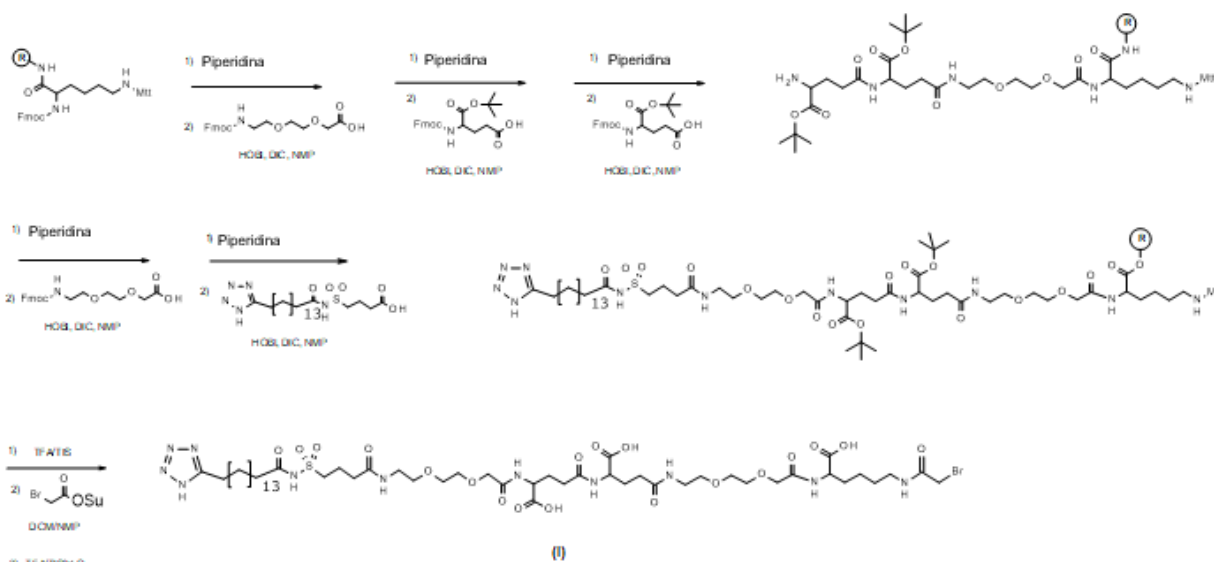
4-(1H-Tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoil)butanoil-OEG- γ Glu- γ Glu-OEG-N^ε(C(O)CH₂Br)Lys-OH (I):



El compuesto (I) se sintetizó en soporte sólido de acuerdo con el esquema 1, en escala de 1 mM mediante el uso de química estándar de Fmoc-péptido en un sintetizador ABI433. El péptido se ensambló en una resina Fmoc-Lys(MTT)-Wang mediante el uso de aminoácidos protegidos Fmoc-OEG-OH y Fmoc-Glu-OtBu. El ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butírico se acopló manualmente mediante el uso de DIC/NHS en DCM/NMP, 2 eq. durante toda la noche, la prueba de TNBS mostró que la reacción se completó. La resina se trató después con 50 ml de DCM/TFA/TIS/agua (94:2:2:2) en un arreglo de flujo continuo hasta que desapareció el color amarillo, ~20 min. seguido por lavado y neutralización con DIPEA/DMF. El ácido bromo acético (4 mM) en DCM/NMP (1:1) se activó con una mezcla de NHS y DIC a 1 mM, se filtró y se añadió a la resina con adición de 1 mM de DIPEA adicional. Después de 1 hora se completó la reacción. La resina se trató con 80 ml de TFA/TIS/agua (95:2,5:2,5) durante 1 hora. Se evaporó con una corriente de N₂, se precipitó por adición de Et₂O y se lavó con Et₂O y se secó. El producto bruto se purificó en HPLC preparativa (2 corridas), con un gradiente de 30-80 % de 0,1 TFA / MeCN contra 0,1 % de TFA en agua. Las fracciones se recogieron y liofilizaron con ~50% de MeCN proporcionando el compuesto (I).

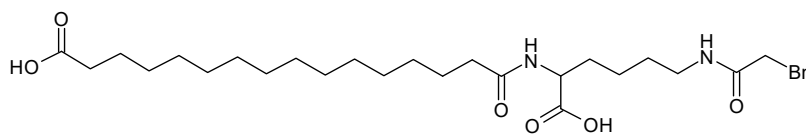
TOF-MS: masa 1272,52 (M+1)

Esquema 1



Ejemplo 2

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.



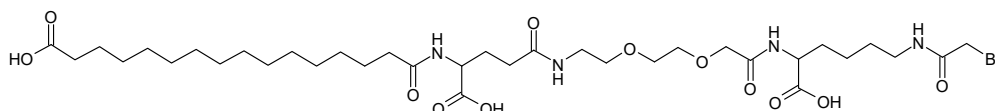
5

TOF-MS: masa 536,52 (M+1)

Ejemplo 3

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 Wang.



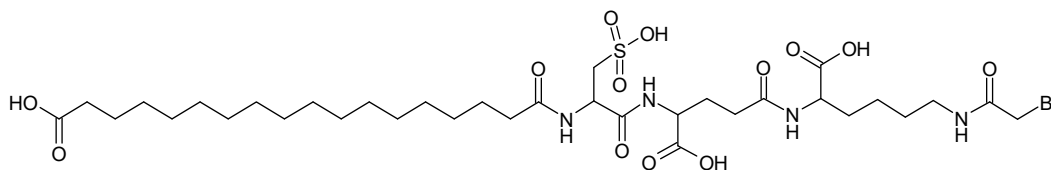
15

20 TOF-MS: masa 810,80 (M+1)

Ejemplo 4

25

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.



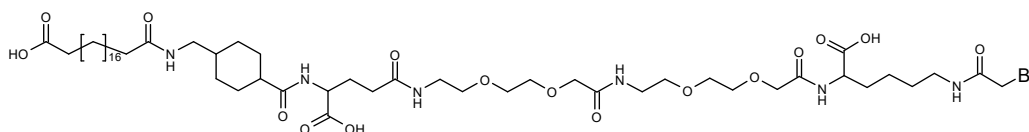
35

TOF-MS: masa 844,84 (M+1)

Ejemplo 5

40

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.



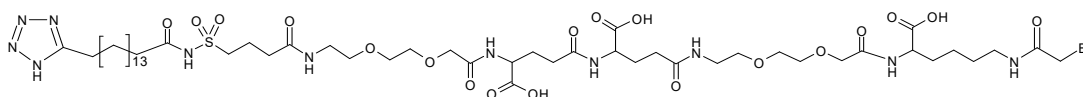
50

TOF-MS: masa 1151,27 (M+1)

Ejemplo 6

55

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.



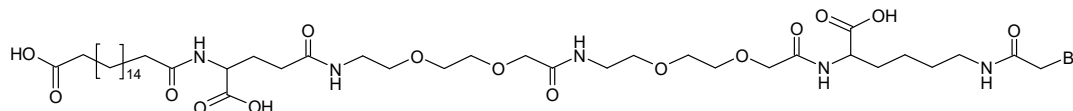
60

65 TOF-MS: masa 1272,30 (M+1)

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 Wang.

5



10

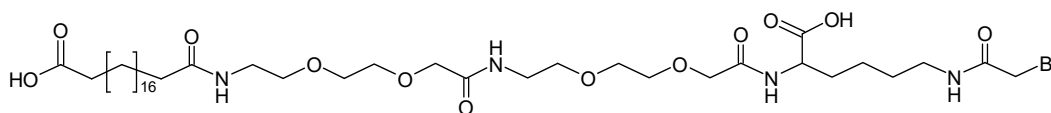
TOF-MS: masa 984,01 (M+1)

Ejemplo 8

15

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.

20



25

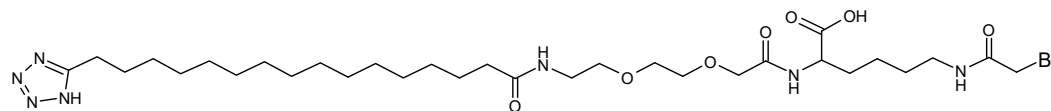
TOF-MS: masa 882,95 (M+1)

Ejemplo 9

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 Wang.

35

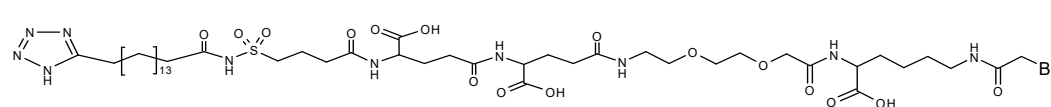


40

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 Wang.

45



50

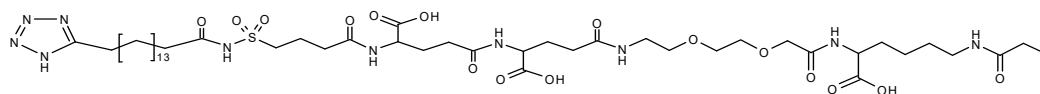
TOF-MS: masa 1127,14 (M+1)

Ejemplo 11

55

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, ácido iodoacético y Resina de Wang.

60

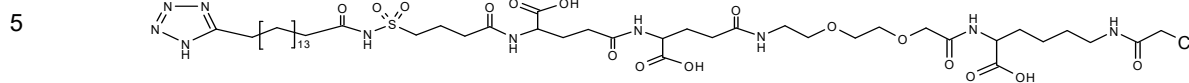


TOF-MS: masa 1174,14 (M+1)

Ejemplo 12

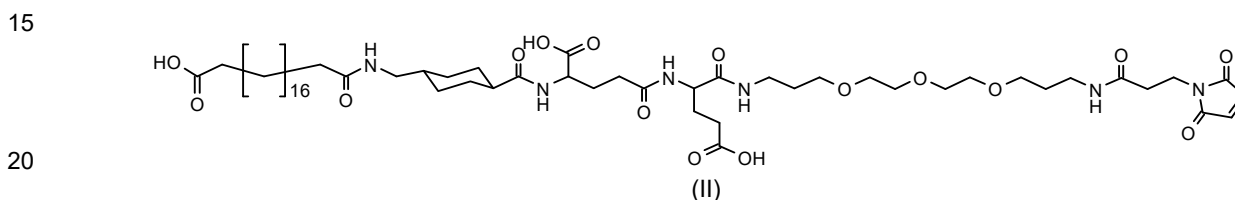
65

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, ácido cloroacético y Resina de Wang.



TOF-MS: masa 1061,89 (M+1)

10
Ejemplo 13
(19-carboxinonadecanoil)-Thx-γGlu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-malimido-propionilamino]propoxi} etoxi)etoxi]propil} amida (II)



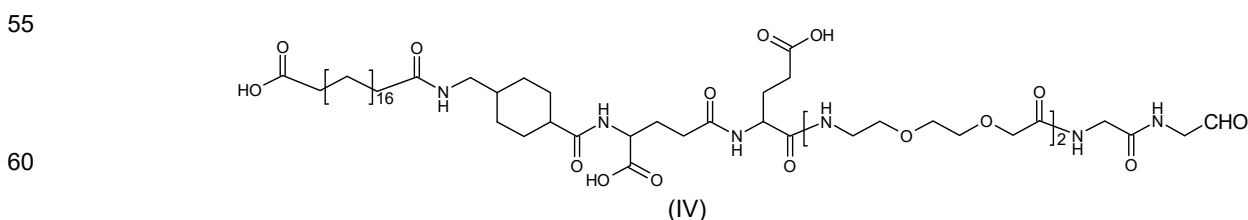
25
La resina de 2-clorotritilo (2,0 g, 2,6 mmol) se hinchó en DCM durante 0,5 h. Se añadió una solución de 4,7,10-trioxa-1,13-diamina en DCM (30 ml). La resina se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La resina se lavó una vez con DCM, después se añadió una solución de DIPEA:MeOH:DCM (15 ml:15 ml:20 ml). La resina se agitó durante 0,5 h, luego se lavó tres veces con DCM. Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu-OtBu y FmocThexOH se acoplaron después secuencialmente mediante química estándar de péptido como sigue: Se mezcló una solución de 0,5 M de Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt en NMP (11,7 ml) y después de 2 min se añadió a la resina. La resina se agitó durante 45 min a rt y luego se lavó con 5xNMP y 5xDCM. Se añadió una solución de Ac₂O/DIPEA/NMP (1:1:5) y la resina se agitó a rt durante 10 min. La resina se lavó (5xNMP y 5xDCM). La resina se trató después con 30 % de piperidina en NMP durante 2x10 min y finalmente se lavó con 5xNMP y 5xDCM. Luego se añadió el péptido a una solución de 0,25 M de eicosanodiácido (6 eq) que contiene 0,125 M de HOAt (3 eq), 0,125 M de DIC (3 eq) y 0,125 M de lutidina (3 eq). La resina se agitó a rt durante 2 horas seguido por lavado con 5xNMP y 8xDCM. El producto se escindió de la resina mediante el uso TFA-DCM al 10 % durante 20 min. La resina se filtró y se trató una vez más con TFA-DCM al 10 % durante otros 20 min. Los filtrados combinados se recogieron, y se evaporaron hasta la sequedad.

35
El producto seco de arriba se disolvió en DMF (6 ml), y se añadió ácido 3 maleimidopropiónico activado por TSTU (prefabricado mediante la reacción de TSTU con ácido 3 maleimidopropiónico en DMF (2 ml) durante 45 min) y DIPEA (200 µl). La mezcla se agitó a rt durante 1 h. La mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad y el residuo se disolvió en agua TFA-MilliQ al 95 % y se agitó a tr durante 20 min. La mezcla se evaporó hasta la sequedad. Al residuo se añadió un mínimo de agua para precipitar el sólido. El precipitado se filtró y se recristalizó de MeCN. Los cristales se recolectaron y se lavaron extensivamente con Et₂O proporcionando el compuesto (II) como un sólido blanco.

40
TOF-MS: masa 1094,39 (M+1).

45
Ejemplo 14

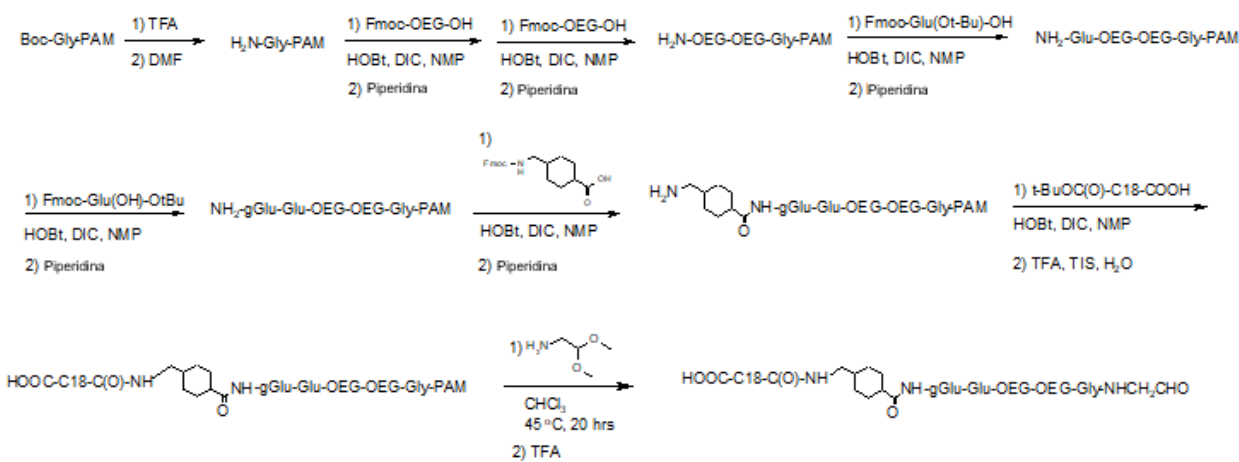
50
De una manera similar como se describió en el Ejemplo 1 anterior y representado en el esquema 2 a continuación, el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de resina de Boc-Gly-PAM como material de partida y aminoácidos protegidos mono-*tert*-butil-ácido eicosanoico, ácido 4-Boc-aminobenzoico, Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu. Después de una desprotección leve, el producto peptídico se escinde de la resina mediante el uso de 2,2-dimetoxietilamina seguido por la desacetilización mediante el uso de TFA que proporciona el unidor de albúmina (IV).



65
TOF-MS: masa 1128,38 (M+1)

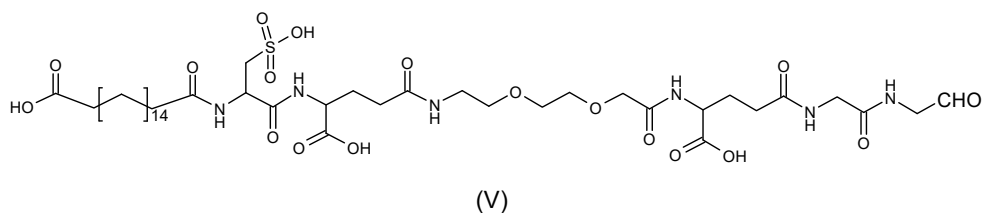
Esquema 2:

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



Ejemplo 15

De una manera similar como se describió en el Ejemplo 14 anterior, el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de resina de Boc-Gly-PAM como material de partida y aminoácidos protegidos mono-*terc*-butil-ácido eicosanoico, ácido 4-Boc-aminobenzoico, Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu. Después de una desprotección leve, el producto peptídico se escinde de la resina mediante el uso de 2,2-dimetoxietilamina seguido por la desacetilización mediante el uso de TFA que proporciona el unidor de albúmina (V).



TOF-MS: Rt = 15,2 min, masa = 967,11 (M+1)

Ejemplo 16

De una manera similar como se describió en el Ejemplo 14 anterior, el compuesto (VI) se preparó mediante el uso de resina Fmoc-Lys(Mtt)-Wang como material de partida y mono-*terc*-butil-ácido octadecanodioico, Boc-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, y aminoácidos protegidos Fmoc-Cys-OH oxidados. El producto peptídico se escinde de la resina mediante el uso de TIS al 2,5 %, H2O al 2,5 % en THF durante 3 horas y se purificó mediante HPLC-prep:

Columna : 2 cm C18

Eluyente A : TFA al 0,1 % i agua Milli-Q

Eluyente B : TFA al 0,1 % i MeCN.

Inicio % de B : 40 %

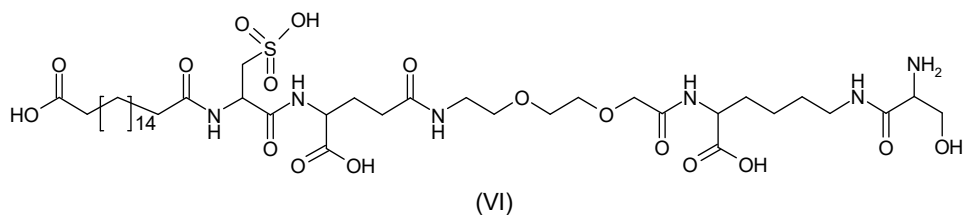
Final % de B : 75 %

Gradiente : 5 min. con MeCN al 10 %, 5-10 min. hasta comenzar % de B durante 51 min, 5 min con % de B final + 10 % de MeCN aprox. 1 h

Las fracciones se analizaron mediante LC-MS-TOF.

Se recogieron las fracciones deseadas, se agruparon y se liofilizaron proporcionando el compuesto (VI)

5



10 TOF-MS: Rt = 6,3 min, masa = 955,1 (M+1)

Oxidación de (VI):

Solución de MTP:

15

3-Metil-tio-1-propanol (290 mg) disuelto en 4 ml 25 mM de HEPES, pH = 7,00

Solución de peryodato:

20

96 mg de NaIO_4 disuelto en 2 ml de agua Milli-Q

A una solución del compuesto (VI) en agua Milli-Q (1 ml) se añadió solución de MTP (3,6 ml) + solución peryodato (560 μl) y el pH se ajustó a 9,5 con una gota de NaOH 1N.

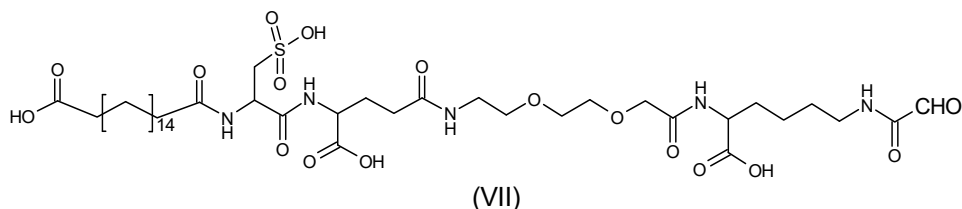
25

El matraz de reacción se cubrió con papel de aluminio y se agitó durante 1 hora a RT. Se añadió una porción adicional de solución de peryodato (560 μl) y la mezcla de reacción se dejó durante 4,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla resultante se corrió a través de dos columnas NAP, para deshacerse del NaIO_4 . Las columnas se lavaron previamente con HEPES 25 mM (5 x 2,5 ml) pH = 7,0.

30

La muestra (2,5 ml) se aplicó en cada columna y se eluyó con 3,5 ml de HEPES 25 mM, pH = 7,00. 2 x 3,5 ml en total - 10,5 ml que contiene cetó-aldehído (VII) que se usaron directamente para la conjugación con un análogo de GH.

35



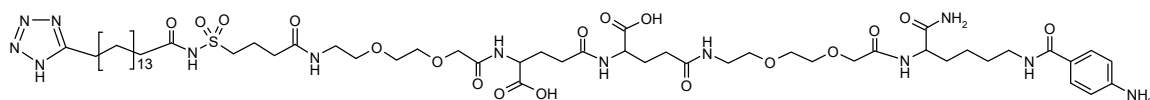
40

TOF-MS: masa 924,08 (M+1)

45 Ejemplo 17

4-(1H-Tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoi)butanoil-OEG- γ Glu- γ Glu-OEG-N^ε(4-aminobenzoyl)Lys-NH₂ (VIII):

50



55

(VIII)

El compuesto (VIII) se sintetizó en soporte sólido de acuerdo con el esquema 3. Se pesó resina de amida de Rink protegida Fmoc (2,2 g, 0,6 mMol/g) en un matraz. La resina se hinchó con NMP (3 x 30 ml) durante 2 hrs. 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 h seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 30 ml). 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). 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

65

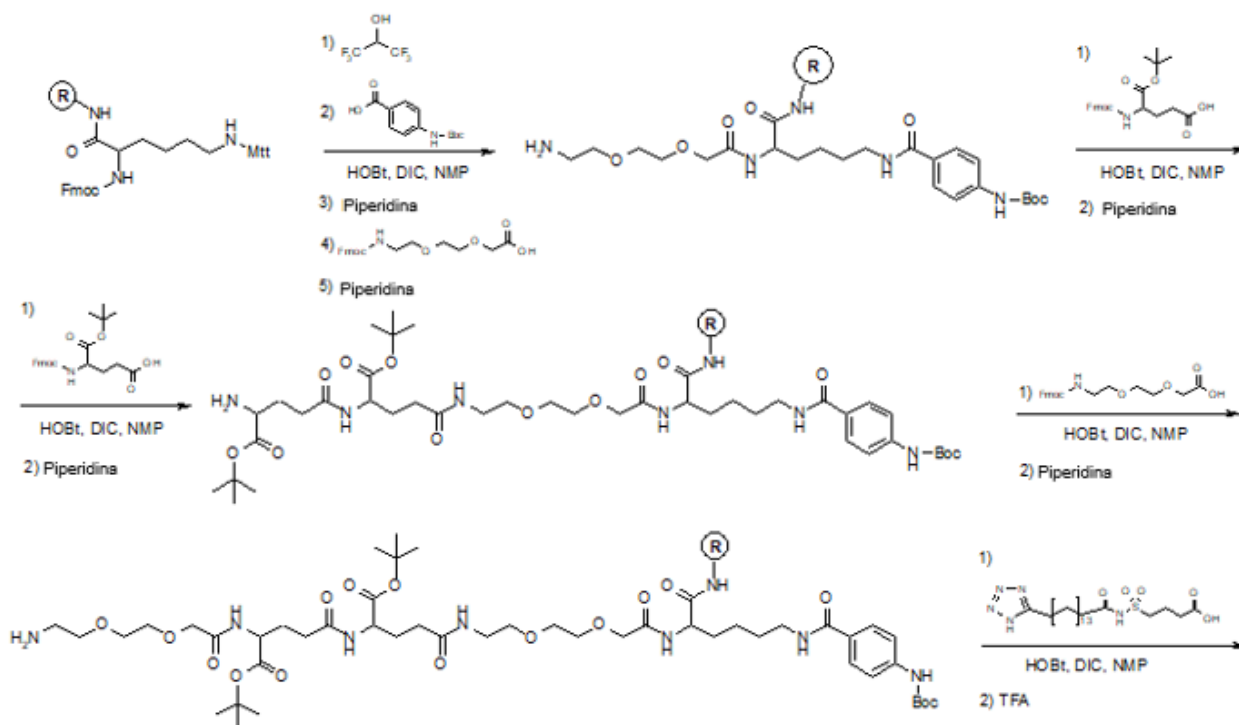
se drenó y se lavó con DCM (3 x 30 ml) seguido por drenaje y lavado con NMP (3 x 30 ml). En un matraz se pesaron ácido 4(Boc-amino)benzoico y HOBt, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (30 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada anteriormente seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 30 ml). 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 h 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 durante 23 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml). 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 h seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml). 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). 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-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). 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 h 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). 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 h seguido por drenaje y lavado con NMP (6 x 15 ml).

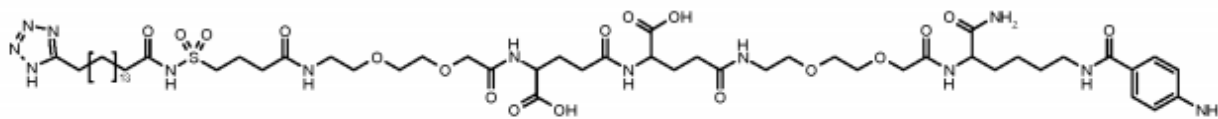
En un matraz se pesaron ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butírico y HOBt, se disolvieron en bromo fenol azul en NMP (15 ml, 0,5 mM). Esta solución se añadió a la resina drenada seguido por la adición de DIC. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 hrs. La resina se drenó y se lavó con NMP (6 x 15 ml) seguido por drenaje y lavado con DCM (6 x 15 ml). La resina se escindió con una mezcla de TFA al 95 % en agua (10 ml) + DCM (0,25 ml) y TIS (0,25 ml). La resina se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y se filtró en Et₂O frío (75 ml). El precipitado resultante se aisló mediante centrifugación seguido por lavado con Et₂O (3 x) y se secó a vacío durante 48 horas para producir 300 mg del compuesto (VIII).

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

TOF-MS: Rt = 4,7 min, masa 1268,71 (M+1)

Esquema 3.

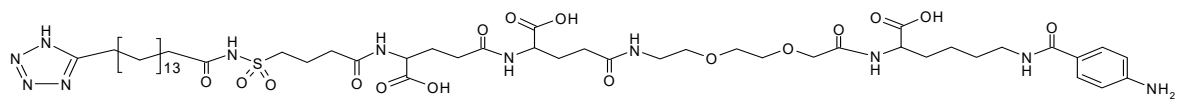




(VIII)

Ejemplo 18

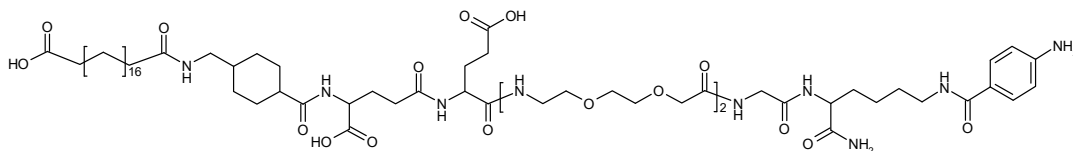
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y Resina de Wang.



TOF-MS: masa 1124,33 (M+1)

Ejemplo 19

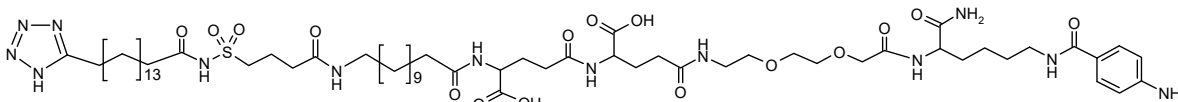
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.



TOF-MS: masa 1333,64 (M+1)

Ejemplo 20

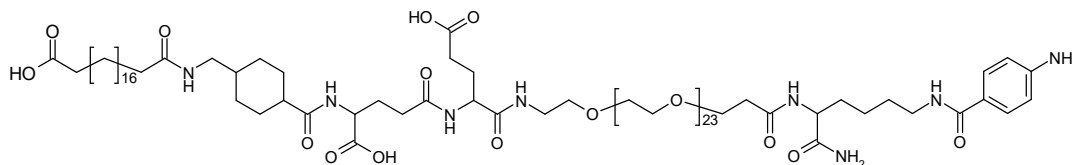
En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.



TOF-MS: masa 1320,67 (M+1)

Ejemplo 21

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

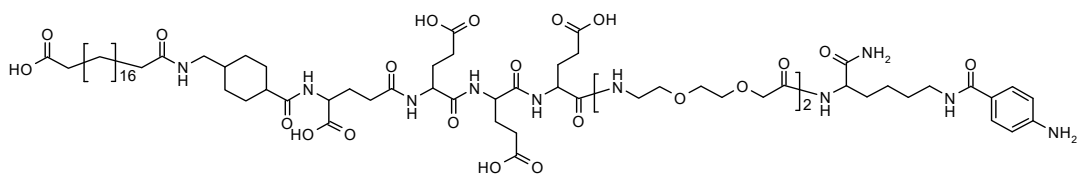


TOF-MS: masa 2114,64 (M+1)

Ejemplo 22

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

5



TOF-MS: masa 1534,82 (M+1)

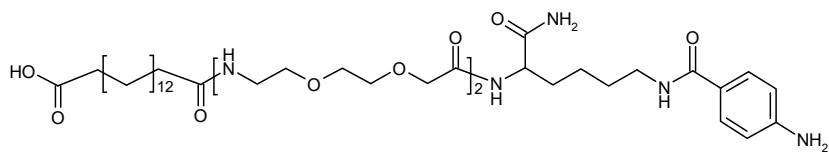
10

Ejemplo 23

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 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 823,05 (M+1)

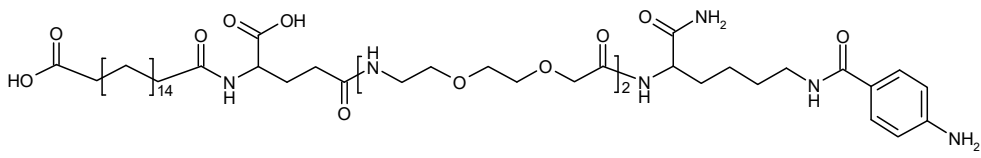
25

Ejemplo 24

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y Resina de Wang.

30

35



TOF-MS: masa 980,22 (M+1)

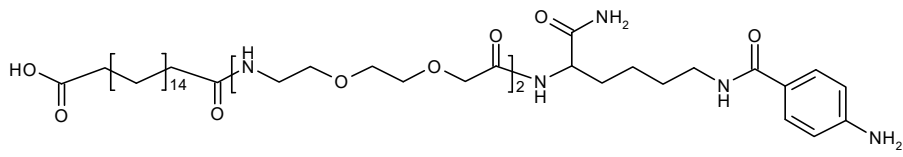
40

Ejemplo 25

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

45

50



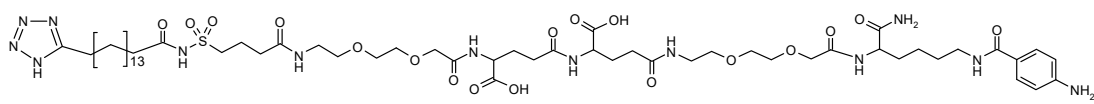
TOF-MS: masa 851,10 (M+1)

55

Ejemplo 26

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

60



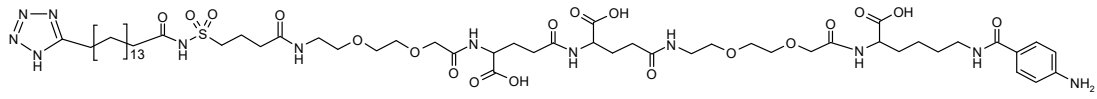
65

TOF-MS: masa 1258,51 (M+1)

Ejemplo 27

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y Resina de Wang.

5



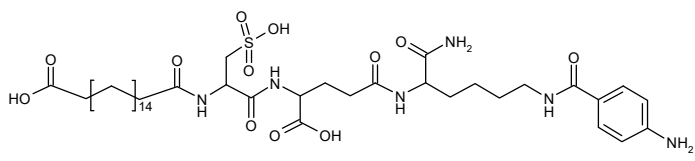
10

TOF-MS: masa 1269,49 (M+1)

Ejemplo 28

15 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

20



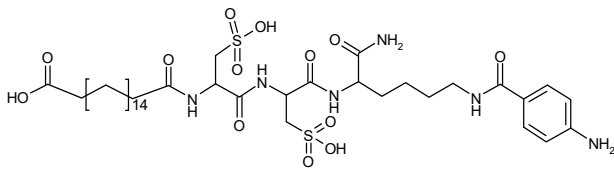
25

TOF-MS: masa 841,04 (M+1)

Ejemplo 29

30 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

35



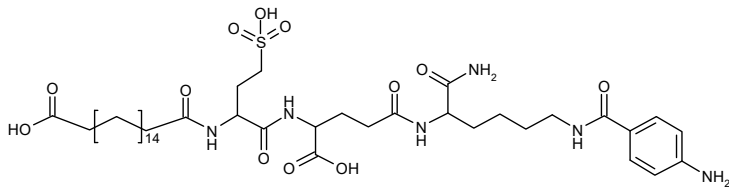
40

TOF-MS: masa 863,07 (M+1)

Ejemplo 30

45 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

50



55

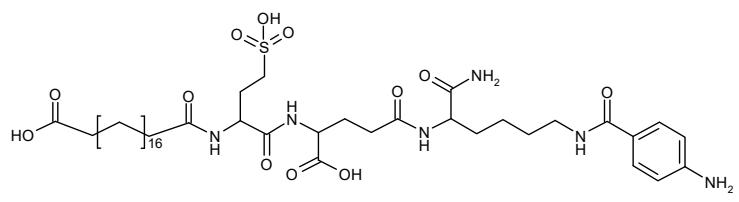
TOF-MS: masa 855,07 (M+1)

Ejemplo 31

60 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

65

5

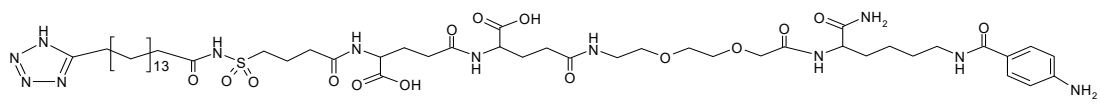


10 TOF-MS: masa 883,12 (M+1)

Ejemplo 32

15 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

20



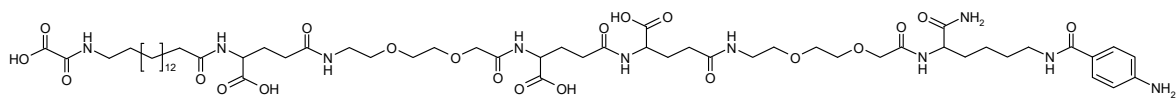
TOF-MS: masa 1123,35 (M+1)

Ejemplo 33

25

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

30



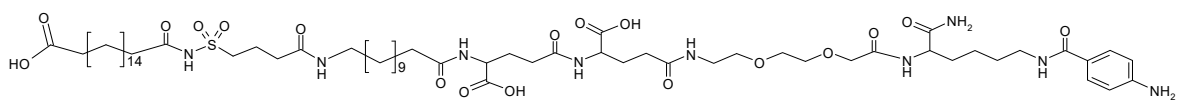
TOF-MS: Rt = 4,7 min, masa 1267,45 (M+1)

35

Ejemplo 34

40 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

40



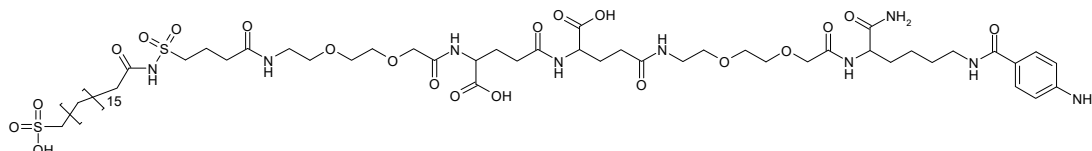
45

TOF-MS: masa 1310,67 (M+1)

Ejemplo 35

50 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

55

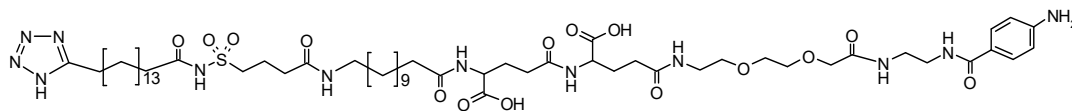


60

TOF-MS: masa 1308,58 (M+1)

Ejemplo 36

65 En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.



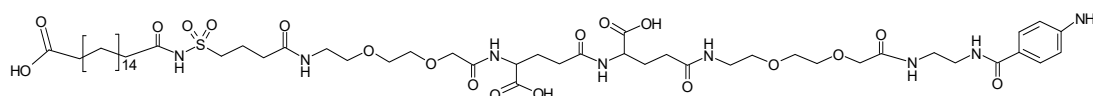
5

TOF-MS: masa 1235,56 (M+1)

Ejemplo 37

10

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.



15

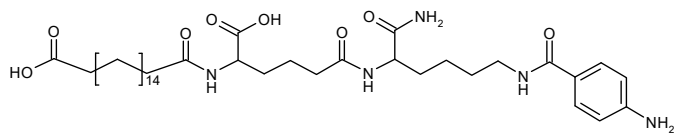
TOF-MS: masa 1173,40 (M+1)

20

Ejemplo 38

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

25



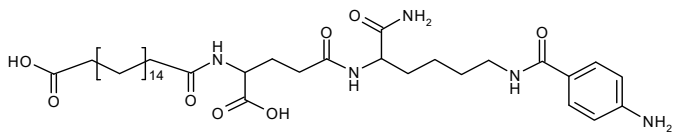
30

TOF-MS: masa 703,93 (M+1)

Ejemplo 39

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Lys(Mtt)-OH y resina de amida de Rink.

35



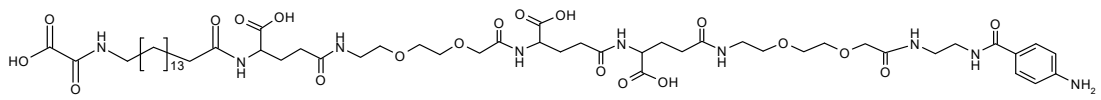
40

TOF-MS: masa 689,90 (M+1)

Ejemplo 40

En una manera similar a la descrita en el ejemplo 17 anterior el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de Fmoc-Glu(ODmab)-OH y resina de cloruro de 2-clorotritilo.

50



55

TOF-MS: masa 1182,34 (M+1)

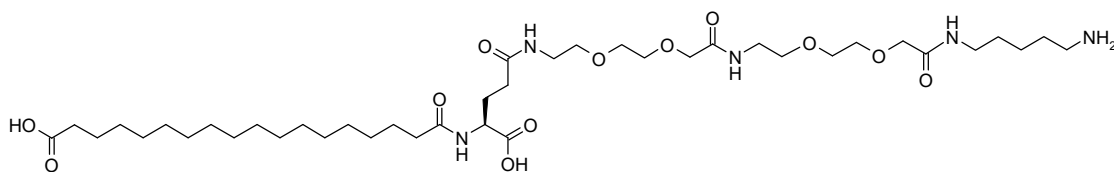
Ejemplo 41

60

ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-[(5-Aminopentilcarbamoil)metoxi]etoxi]etilcarbamoil)-metoxi]etoxi]etilcarbamoil)-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico:

65

5



10

15

N-*tert*-butoxicarbonil cadaverina (24,3 mg; 0,12 mmol) se añadió a una solución de ácido 17-((S)-1-Carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]etilcarbamoil}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)-heptadecanoico (100 mg; 0,12 mmol) y DIPEA (46,68 mg; 0,36 mmol) en THF (2,0 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y después se concentró al vacío. El residuo se disolvió en una mezcla de agua (5 ml) y THF (2 ml), y se purificó mediante HPLC preparativa (columna RP18). Las fracciones que contenían el producto de acoplamiento protegido con Boc se agruparon y se dejaron secar. El residuo se disolvió en TFA-DCM al 50 % (4 ml) y se agitó durante 1h a temperatura ambiente, luego se concentró *al vacío* para proporcionar 54 mg (55 %) del material del título como su sal de ácido trifluoroacético.

TOF-MS: masa 815,5 (M+1)

20

Preparación de compuestos de unión a albúmina de GH:

Ejemplo 42 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

25

El uso de una transglutaminasa para unir una cola a GH se ha descrito anteriormente en el documento núm. WO2005/070468 y puede usarse de acuerdo con la presente invención para la unión de un unidor de albúmina. La TGasa usada es la transglutaminasa microbiana de *Streptovorticillium mobaraense* de acuerdo con el documento US5156956. Un método general se describe en la sección anterior Química I.

30

1. Acoplamiento del compuesto de GH (I) transaminado y oxidado con un unidor de albúmina (II)

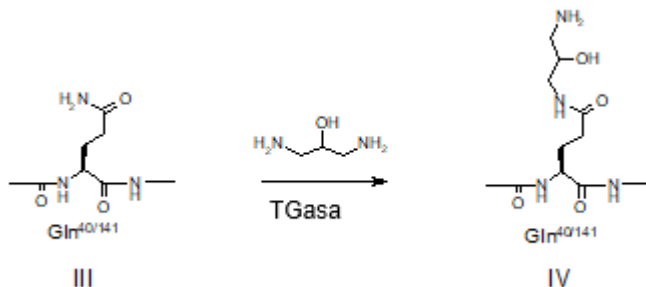
Se preparó la siguiente solución:

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

35

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

40



45

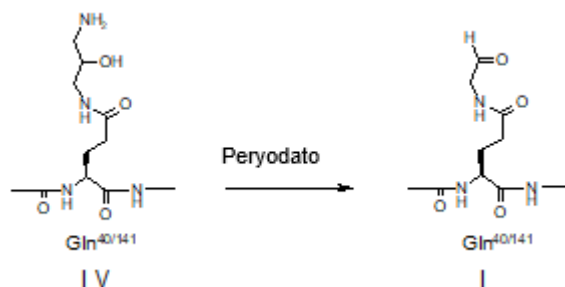
50

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.

55

Oxidación de un compuesto de GH transaminado (IV):

60



65

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.

5 Se prepararon las siguientes soluciones:

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

Tampón B: 3-metilpropanol (725 mg, 7,1 mmol) se disolvió en el Tampón A (10 ml).

10

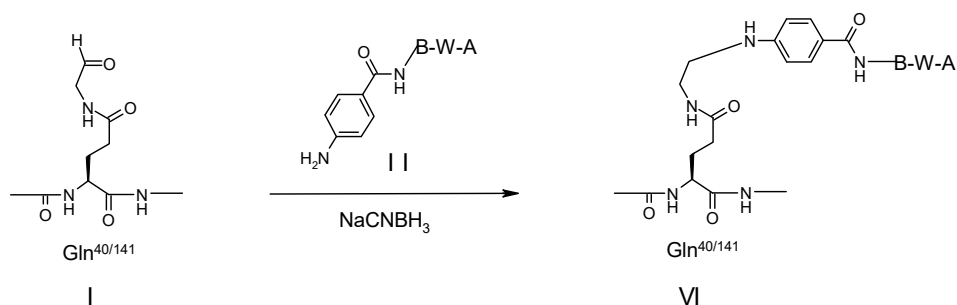
Tampón C: HEPES (5,96 g) se disolvió en agua (1,0 L) y el pH se ajustó a 7,0

Peryodato: NaIO₄ (48,1 mg, 0,225 mmol) se disolvió en agua (1,0 ml).

15 A una solución de (IV) (10 mg, 0,5 μmol) se añadió Tampón B (0,2 ml) seguido por la solución de peryodato (0,03 ml). Después de 20 min de incubación en frío la mezcla se dializa 4 veces con tampón C. El residuo se concentra hasta 1 ml.

(C) Aminación reductora de (I) con unidor de albúmina (II)

20



30

Puede usarse el unidor de albúmina (II) como se describió en el Ejemplo 17 al 40.

35

La solución final de (B) (1 ml, 10 mg, 0,45 μmol (I)) se mezcló con una solución de unidor de albúmina (II) (2 ml, 10 mg, 0,3 μmol) en tampón HEPES 25 mM pH 7,0 y la mezcla resultante se hizo rotar lentamente a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 1 hr se añadió NACNBH₃ (100 μl de una solución de NACNBH₃ (20 mg) en agua (0,5 ml)) en forma de porciones. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18-24 horas.

40

La última reacción puede realizarse de la siguiente manera:

A una solución de GH transaminada oxidada se añade una solución del enlazador del grupo de unión a la albúmina 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.

45

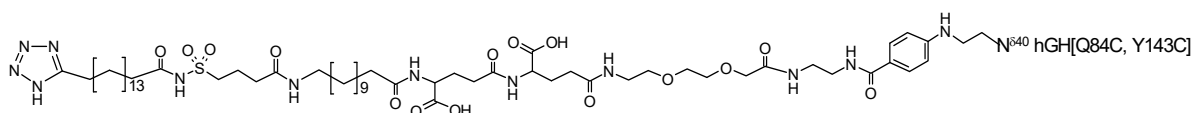
El conjugado puede aislarse mediante cromatografía de intercambio aniónico de la siguiente manera: El ácido acético se elimina mediante el cambio de tampón con agua pura (3X) mediante el uso de dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) mediante centrifugación a 4000 rpm/min durante 3 x 8 min. La mezcla se cambia de tampón a TEA 20 mM, pH: 8,50 mediante el uso de dispositivos de filtro de Amicon y se diluye a un volumen final de 50 ml con TEA 20 mM, antes de cargarla en una columna Hiload Q Sepharose, columna 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

50

55

Al usar el grupo de unión a la albúmina del Ejemplo 18 resultará en el siguiente compuesto 42.1 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

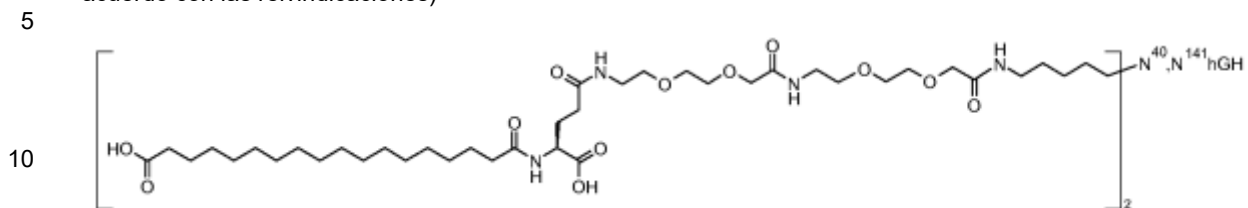
60



65

TOF-MS: masa 23301,63

El siguiente compuesto se preparó mediante el uso del grupo de unión a la albúmina del Ejemplo 41 42.2 (no de acuerdo con las reivindicaciones)



TOF-MS: masa 23727,6245

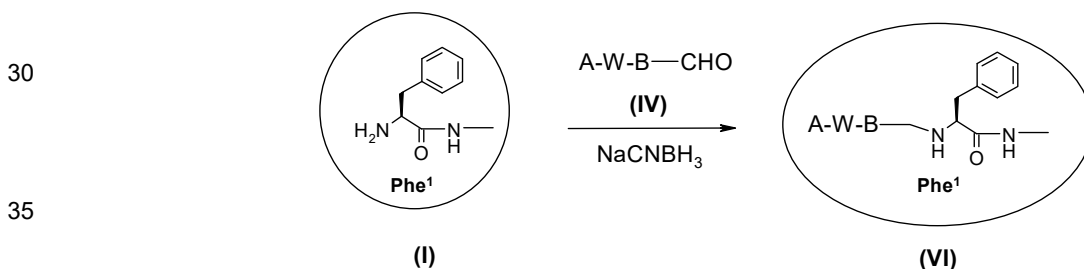
15 A una solución de hGH (1 mg, 45 nmol) y ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-aminopentylcarbamoyl)metoxi]etoxi}etilcarbamoyl)metoxi]etoxi}etilcarbamoyl)-1-carboxi-propilcarbamoyl]heptadecanoico (2,10 mg; 2250 nmol) en trietanolamina 20 mM (1000 μ l; pH 8,5) se añadió TGasa (0,12 nmol; *Streptoverticillium mobaraense*). La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 146 hrs, donde se obtuvo el análogo doblemente derivatizado de hGH de la fórmula anterior.

20

Ejemplo 43 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

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

25 (A) Alquilación reductora de (I) con un aldehído del grupo de unión a la albúmina (IV)

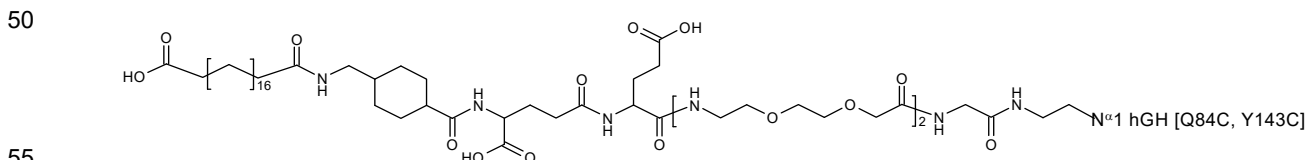


40 El proceso de derivatización como se muestra anteriormente utiliza un enlazador de unión a albúmina A-W-B en donde B tiene una funcionalidad de aldehído terminal. La conjugación de hGH con A-W-B-CHO se produce mediante alquilación reductora (hGH) \rightarrow VI). La alquilación reductora se ejemplifica en la presente descripción y se conoce bien en la técnica y da como resultado compuestos de hGH modificados en la posición N-terminal.

45 El grupo de unión a la albúmina (IV) se obtuvo como se describe en el ejemplo 14.

Síntesis de: 2-(C₂₀diácido-Trx- \square Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Glicina amida)-etil-N⁴¹-hGH [Q84C, Y143C]

43.0 (no de acuerdo con las reivindicaciones)



60 hGH[Q84C, Y143C] (23 mg) se disolvió en tampón Hepes (2,3 ml 0,25 mM pH 7,0). C₂₀diácido-Trx- γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-dimetilacetal (2 mg, véase el ejemplo 14 anterior) se trató con TFA (50 μ l) durante 6 min y se evaporó hasta la sequedad en vacío. El residuo se extrajo de nuevo con EtOH (200 μ l) y se evaporó hasta la sequedad a vacío. El residuo se disolvió en DMF (100 μ l) 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 μ l)) 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 TFA al 0,1 % EN MeCN de 40-80 % contra TFA al 0,1 % en agua. El último pico eluyente se recolectó, se diluyó de 70 % de MeCN a 10 % con agua y se liofilizó proporcionando 4,51 mg de 2-(C₂₀diácido-Trx- \square Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Glicina amida)-etil-N⁴¹-hGH [Q84C, Y143C].

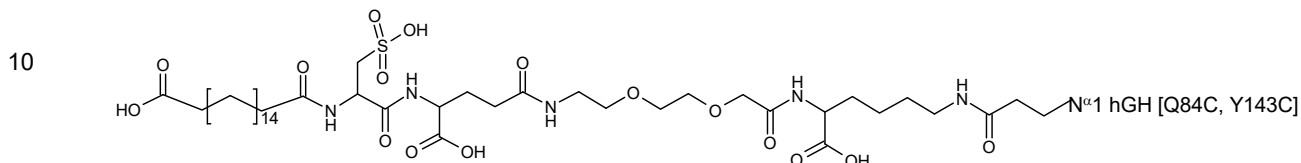
65

TOF-MS: Rt = 15,25 min, masa = 23 150

En una manera similar como se describió anteriormente el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina del ejemplo 16.

5

43.1 (no de acuerdo con las reivindicaciones)



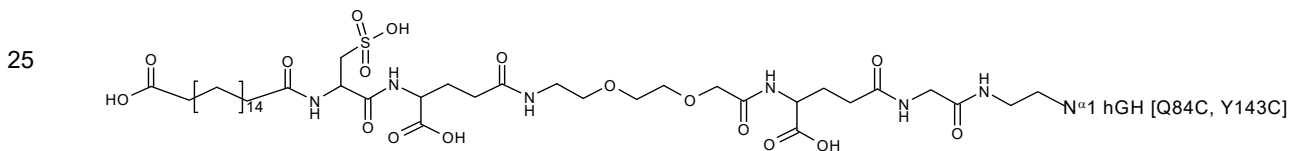
15

TOF-MS: Rt = 15,2 min, masa = 23 033

En una manera similar como se describió anteriormente el siguiente compuesto se preparó mediante el uso de un grupo de unión a la albúmina del ejemplo 15.

20

43.2 (no de acuerdo con las reivindicaciones)



30

TOF-MS: Rt = 15 min, masa = 22 989,1

Ejemplo 44

35

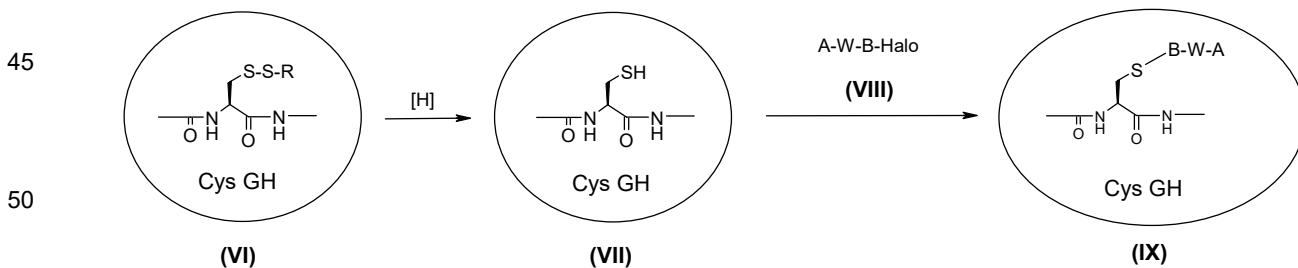
1. Acoplamiento de un compuesto de GH (VII) que tiene una única Cys libre interna con un grupo de unión a la albúmina (VIII)

40

1) Liberación de GH (VII) Cys libre mediante reducción de disulfuro (VI) con un agente de reducción selectivo adecuado:

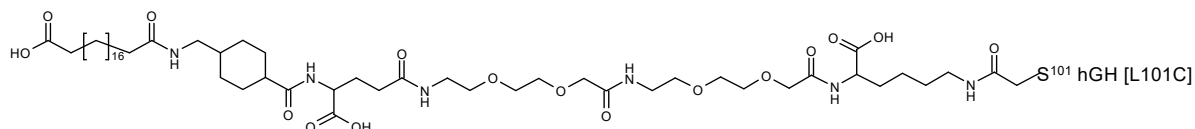
40

2) Alquilación de GH (VII) Cys libre con un grupo de unión a la albúmina activado por halógeno (VIII) que proporciona el compuesto de GH conjugado con Cys (IX)



44.1

55



60

2-(C₂₀diácido-Trx-□Glu-OEG-OEG-δLys)-carbonilmetileno-S¹⁰¹-hGH[L101C]

65

Preparación de hGH[L101C] (VII):

ES 2 745 484 T3

hGH[L101C] como se obtuvo anteriormente tuvo parte de su cisteína libre bloqueada con glutatión y cistamina. El desbloqueo se realizó enzimáticamente mediante el uso de glutaredoxina II (Grx2) en un tampón de equilibrio que contiene GSH y GSSG. El hGH[L101C] desbloqueado se separó del GSH/GSSG de bajo peso molecular mediante intercambio de tampón en una columna Sephadex G25.

- 5 Conjugación del grupo de unión a la albúmina (VIII) con hGH[L101C] (VII):
- Se disolvió el grupo de unión a la albúmina del ejemplo 5 (78 mg, 5 eq) en 170 ml de tampón HEPES/EDTA con 5 % hidroxipropil-β-ciclodextrina y se añadió MTP (2,1 ml, 1 %) y NaCl 0,5 M (6,34 g).
- 10 A esta mezcla se añadió hGH[L101C] concentrado (1 eq, 46 ml) y la mezcla se dejó durante la noche a RT. La solución se volvió turbia durante toda la noche. Como la HPLC indicó, se añadió otros 5 eq. de grupo de unión a la albúmina de material de partida sin reaccionar del ejemplo 5 disuelto en un mínimo de NMP. La mezcla resultante se agitó a RT durante otras 16 horas.
- 15 Purificación:
- Tampones usados:
- 20 Tampón A:
- trietanolamina 20 mM (TEA) + etilen glicol al 10 %
5,96 g de trietanolamina
- 25 200 ml de etilen glicol
- agua MQ añadida a 2 L.
- pH ajustado a 8,5 con HCl 1N
- 30 Tampón B:
- trietanolamina 20 mM (TEA) + NaCl 1,0 M + etilen glicol al 10 %
- 35 5,96 g de trietanolamina
- 116,88 g de NaCl
- 200 ml de etilen glicol
- 40 agua MQ añadida a 2 L.
- pH ajustado a 8,5 con HCl 1N
- 45 El tampón de reacción se cambió al tampón A-TEA con etilen glicol en una columna Sephadex durante 3 corridas:
- Columna: 50/30 Sephadex G25 fino
- Tampón A:
- 50 Flujo: 10 ml/min
- Temp: RT (fracciones recolectadas a 12 °C)
- 55 Fracciones: 30 ml por fracción
- Las fracciones deseadas se recolectaron, agruparon y después se purificaron en una columna de Q Sepharose:
- Columna: 26/10 Q Sepharose HP
- 60 Tampón A:
- Tampón B:
- 65 Gradiente 1: Tampón B al 0-10 % durante 1 CV

ES 2 745 484 T3

Gradiente 2: tampón B al 10-40 % durante 20 CV

Gradiente 3: Tampón B al 40-100 % durante 1 CV

5 Flujo: 8 ml/min

Temp: RT (fracciones recolectadas a RT)

Fracciones: 5 ml por fracción

10 Las fracciones deseadas se recolectaron, mezclaron y se intercambió el tampón a 10 mM de amonio-bicarbonato pH 8,0 en una columna Sephadex G25:

15 Columna: 50/30 Sephadex G25 fino

Tampón A: 10 mM de amonio-bicarbonato pH 8,0

Flujo: 10 ml/min

20 Temp: RT (fracciones recolectadas a 12 °C)

Fracciones: 30 ml por fracción

Se agruparon cinco fracciones y se liofilizaron.

25 La mezcla se analizó por MS y se observaron grandes cantidades de dímero (MS 44491,7).

Los viales liofilizados se disolvieron en tampón A y se purificaron nuevamente en una nueva columna Q Sepharose:

30 Columna: 26/10 Q Sepharose HP

Tampón A:

Tampón B:

35 Gradiente 1: Tampón B al 0-10 % durante 1 CV

Gradiente 2: tampón B al 10-40 % durante 20 CV

Gradiente 3: Tampón B al 40-100 % durante 1 CV

40 Flujo: 8 ml/min

Temp: RT (fracciones recolectadas a RT)

45 Fracciones: 5 ml por fracción

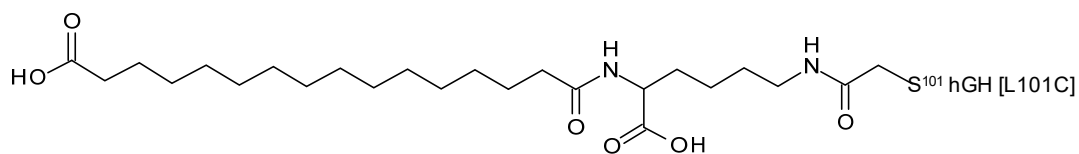
Las fracciones se agruparon y se desalaron/se cambió el tampón a 10 mM de amonio-bicarbonato por ultrafiltración. La mezcla se concentró hasta 25 ml y se cuantificó por RP-HPLC y MS-TOF:

50 TOF-MS: Rt = 16,15 min, masa = 23 315,96

Los compuestos siguientes se prepararon mediante el uso del mismo método.

44.2

55

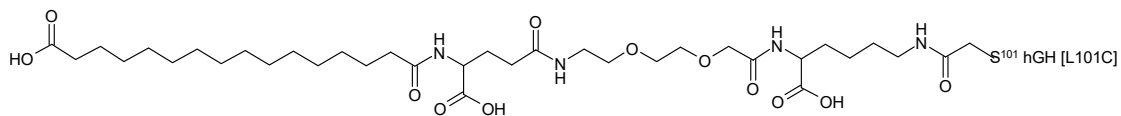


60

TOF-MS: Rt = 15,24 min, masa = 22 676,8

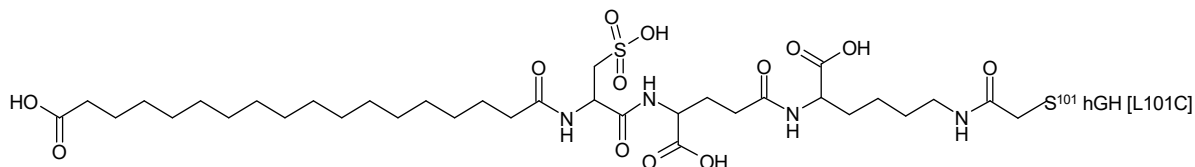
65

44.3



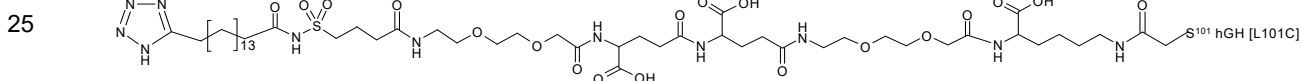
44.4

10



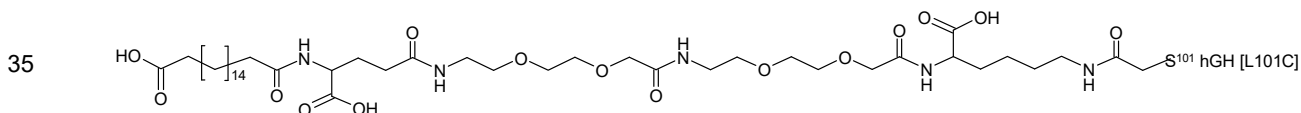
20

44.5



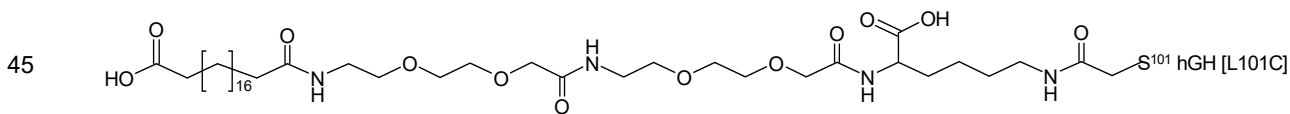
30

44.6



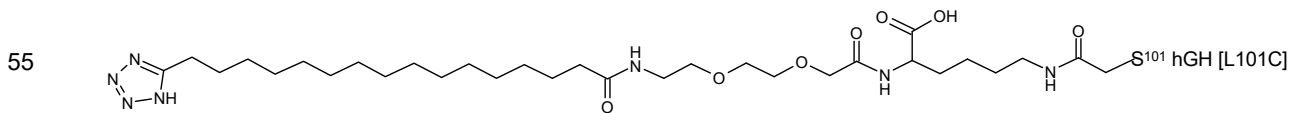
40

44.7



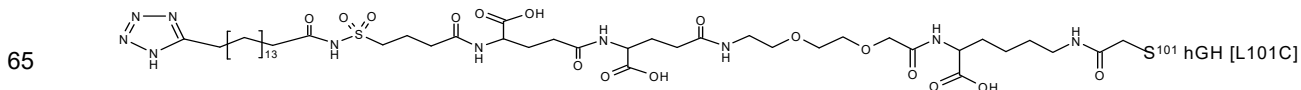
50

44.8



60

44.9

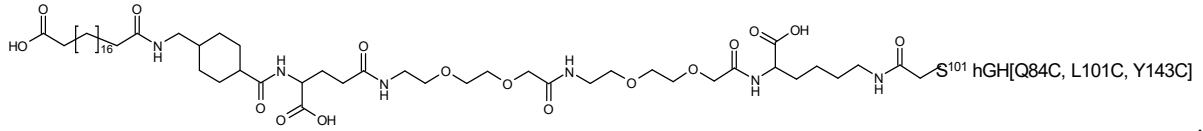


ES 2 745 484 T3

TOF-MS: Rt = 14,6 min, masa = 23 291,4

44.10

5

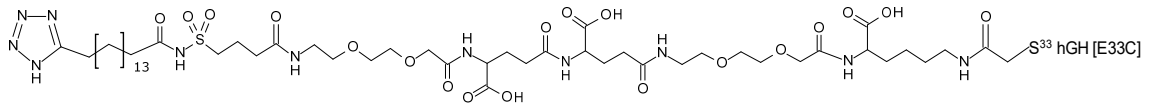


10

TOF-MS: Rt = 15,05 min, masa = 23 097,76

44.11

15

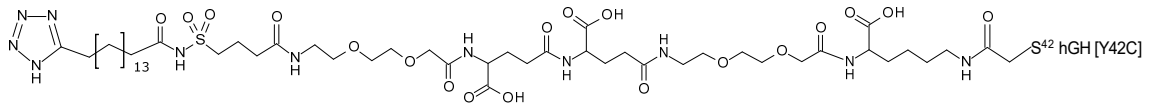


20

TOF-MS: Rt = 14,2 min, masa = 23 420,83

44.12

25

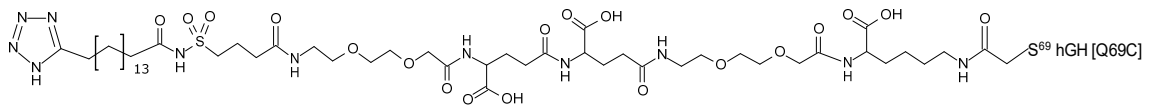


30

TOF-MS: Rt = 15,7 min, masa = 23 289,6

44.13

35

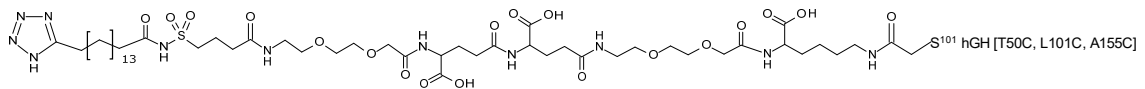


40

TOF-MS: Rt = 17,0 min, masa = 23 324,55

44.15

45

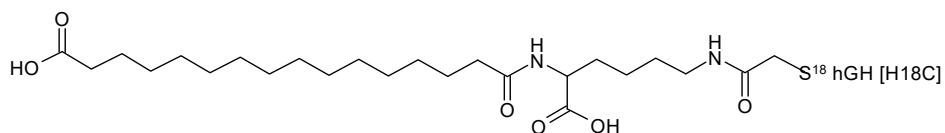


50

TOF-MS: Rt = 12,85 min, masa = 23 337,5

44.16

55



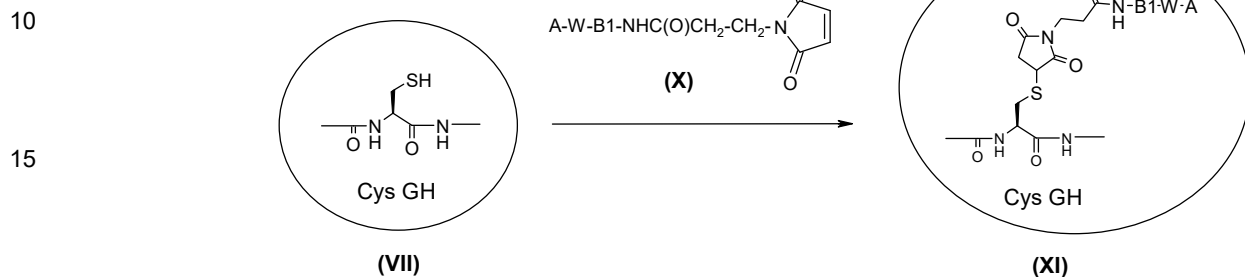
60

TOF-MS: Rt = 15,24 min, masa = 22 676,8

Ejemplo 45

1. Acoplamiento de un compuesto de GH (VII) que tiene una única Cys libre interna con un grupo de unión a la albúmina (X)

1) Alquilación de GH (VII) Cys libre con un grupo de unión a la albúmina sustituido con malimida (X) que proporciona el compuesto de GH conjugado con Cys (XI)



25 El compuesto de GH de Cys desprotegido (VII) como se obtuvo anteriormente en el Ejemplo 44 puede hacerse reaccionar con un enlazador de unión a la albúmina sustituido con malimida (X) lo que proporciona el conjugado de GH A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-pirrolidin-2,5-diona-3-hGH (XI) en donde B1 se define como se describió en la Química IV anterior.

25 Conjugación del grupo de unión a la albúmina funcionalizado con Maleimida (X) a hGH L101C

Etapa (a) de desbloqueo del residuo de cisteína

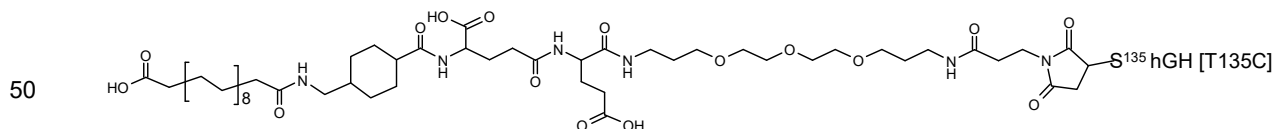
30 El hGH Cys bloqueado con glutatión/cisteamina (VI) se desbloqueó enzimáticamente mediante el uso de glutaredoxina II (Grx2) en un tampón de equilibrio que contiene GSH y GSSG. El hGH Cys desbloqueado (VII) se separó del GSH/GSSG de molecular bajo mediante intercambio de tampón en una columna Sephadex G25.

35 *Etapa (b) de acoplamiento al grupo de unión a la albúmina funcionalizado con maleimida (X)*

El grupo de unión a la albúmina funcionalizado con maleimida (X) se disolvió en tampón que contiene 5 % hidroxipropil-β-ciclodextrina. Luego se añadió la solución a hGH Cys desbloqueado (VII) y se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente.

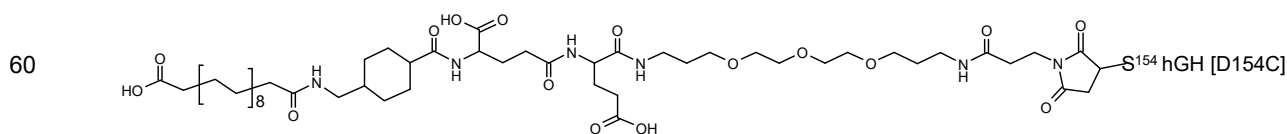
40 Después de la conjugación la proteína conjugada se purificó en una columna Q Sepharose HiLoad en 20 mM de tampón de trietanolamina que contenía etilen glicol al 10 % a pH 8,5 mediante el uso de un gradiente de cloruro de sodio. Las fracciones recolectadas se agruparon y se transfirieron a 10 mM de amonio bicarbonato mediante el uso de una columna G25 y se liofilizaron.

45 45.1



55 TOF-MS: Rt = 16,0 min, masa = 23 352

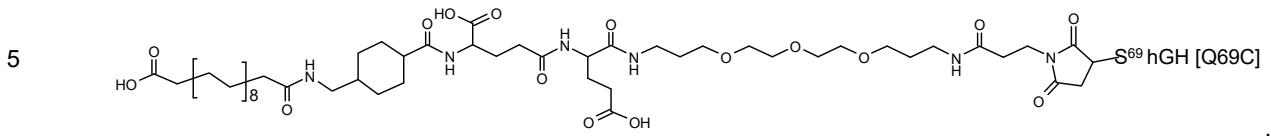
45.2



65 TOF-MS: Rt = 15,98 min, masa = 23 338

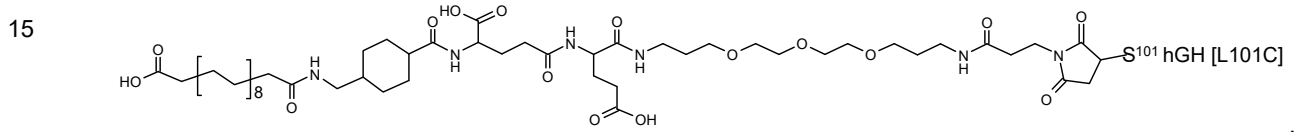
ES 2 745 484 T3

45.3



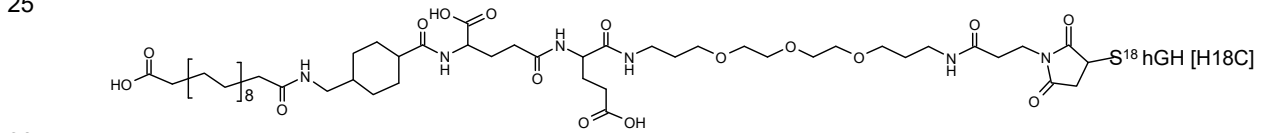
10 TOF-MS: Rt = 16,62 min, masa = 23 324,6

45.4



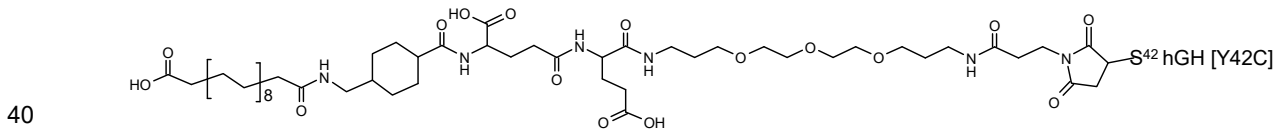
20 TOF-MS: Rt = 16,20 min, masa = 23 339,7

45.5



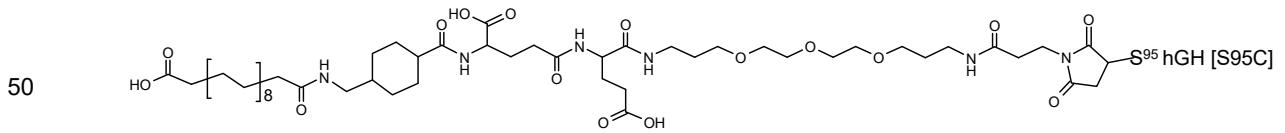
30 TOF-MS: Rt = 15,72 min, masa = 23 316,35

45.6



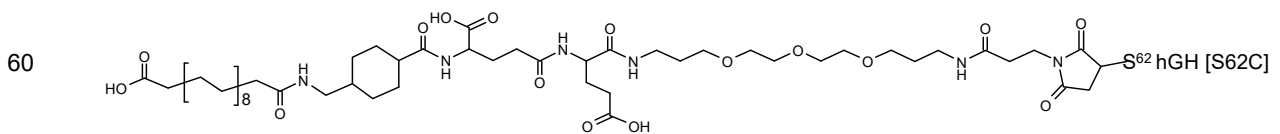
40 TOF-MS: Rt = 17,2 min, masa = 23 365,9

45.7



55 TOF-MS: Rt = 17,2 min, masa = 23 366

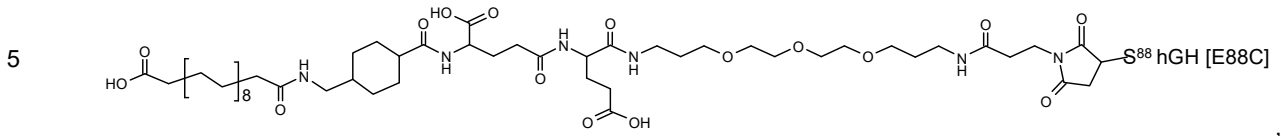
45.8



65 TOF-MS: Rt = 16,5 min, masa = 23 366

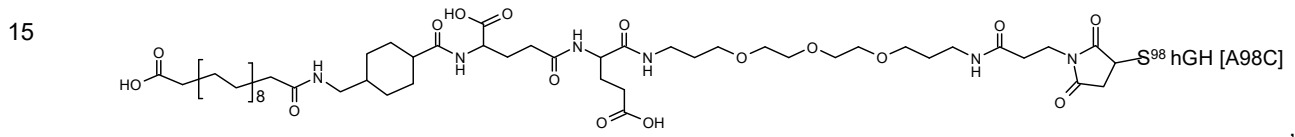
ES 2 745 484 T3

45.9



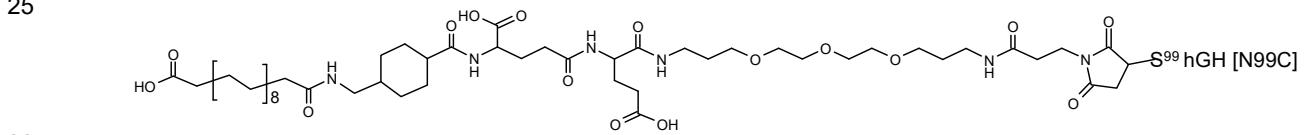
10 TOF-MS: Rt = 16,8 min, masa = 23 323,8

45.10



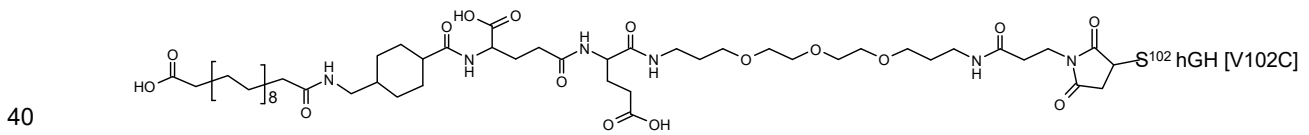
20 TOF-MS: Rt = 17,1 min, masa = 23 382

45.11



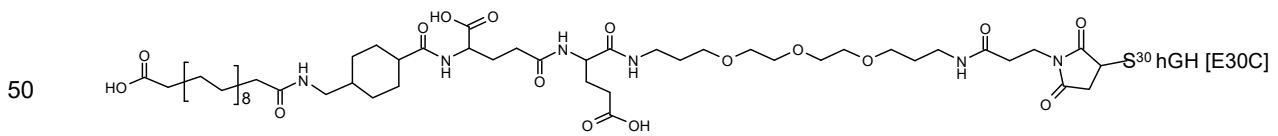
30 TOF-MS: Rt = 17,2 min, masa = 23 338,8

45.12



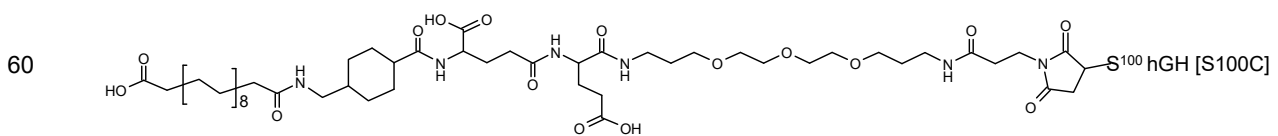
40 TOF-MS: Rt = 17 min, masa = 23 353,9

45.13



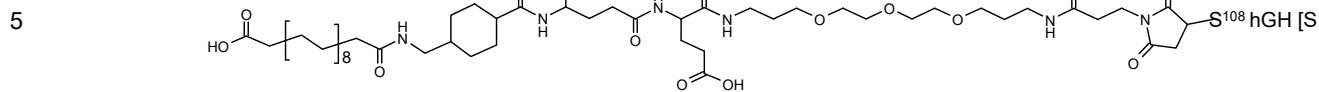
55 TOF-MS: Rt = 15,65 min, masa = 23 323,7

45.14



65 TOF-MS: Rt = 16,5 min, masa = 23 365,8

45.15



10 TOF-MS: Rt = 17,2 min, masa = 23 365,9

Ejemplo 46

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

20 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.

25 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 %.

30 Las células se lavan y se 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.

35 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 %).

40 La potencia *in vitro* del compuesto 45.4 en el ensayo del receptor de hGH en BAF-3 se muestra en la Tabla 1 a continuación.

La estabilidad a proteasa del compuesto 45.5 se determinó como se describe en el método general mediante

45 la incubación del compuesto durante 4 horas con quimotripsina o elastasa. Se midió el porcentaje de compuesto de GH intacto y los resultados se incluyeron en la tabla 1.

Tabla 1. Datos en relación con el compuesto 45.4

50

Compuesto	EC50 (nM)	Relación (EC ₅₀ cmp/EC ₅₀ hGH)	n	Quimotripsina (% de compuesto de GH intacto)	Elastasa (% de compuesto de GH intacto)
hGH	0,026±0,012	1	6	40	25
45.4	0,09±0,043	3,5	6	75	65

55

Ejemplo 47

60 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 subcutánea (s.c.).

65

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.

5 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 2.

10

Tabla 2. Programa del muestreo de sangre para cada compuesto de prueba.

15

20

25

30

Animal núm.	Vía de admin.	Tiempo de muestreo (h)													
		Pre dosis	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	
3				X	X	X	X								
4				X	X	X	X								
5			X									X			
6			X									X			
7	i.v.				X	X			X	X		X	X	X	
8					X	X			X	X		X	X	X	
9		X	X									X			
10		X	X									X			

35

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.

40

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.

45

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).

Tabla 3. Vida media (t_{1/2}) y tiempo medio de residencia (MRT) de los compuestos de GH de los ejemplos en ratas Sprague Dawley después de la administración i.v. y s.c. de una dosis única

50

55

60

65

Compuesto (Ejemplo #)	Vía de admin.	T _{1/2} (h)	MRT (h)
43.0 (no de acuerdo con las reivindicaciones)	i.v.	7,2	9,8
43.2 (no de acuerdo con las reivindicaciones)	i.v.	4,4	7,4
44.1	i.v.	5,6	7,2
44.3	i.v.	1,3	0,9
44.4	i.v.	2,5	2,7
44.5	i.v.	4,1	6,8
44.6	i.v.	3,2	4,0
44.7	i.v.	3,8	6,0

44.9	i.v.	4,2	6,5
44.10	i.v	4,1	7,1
45.4	i.v.	8,6	9,8
45.4	s.c.	19,8	31,2

La biodisponibilidad del ejemplo 45.4 se estimó en 48,3 %. El tiempo hasta la concentración plasmática máxima (t_{máx}) después de la administración subcutánea fue de 8,0 hrs. La C_{máx} fue de 1670 y 151 nM después de la administración i.v. y s.c., respectivamente. La concentración plasmática extrapolada al tiempo cero después de la administración i.v. fue de 1710 nM.

Ejemplo 48

La potencia *in vitro* y las vidas medias de una serie de compuestos se determinaron como se describió anteriormente. Los conjugados de los compuestos son idénticos pero se unen por medio de una cisteína alternativa introducida por mutación como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Potencia *in vitro* y vidas medias (t_{1/2}).

Compuesto	Potencia <i>in vitro</i>	T _{1/2} (i.v. Rata) (hora)	MRT (hora)	Sitio de unión (variante)
hGH	1,0 (def)	0,23		-
45.1		2,6	3,8	T135C
45.2		2,8	8,7	D154C
45.3		2,1	3,1	Q69C
45.4	2,9	6,3/8,6	7,8/9,8	L101C
45.5		4,1	4,5	L18C
45.6		4,1	5,5	Y42C
45.7		0,72	6,5	S95C
45.8		0,59	2,0	S62C
45.9		1,8	4,1	E88C
45.10	2,6	3,4	4,3	A98C
45.11	3,1	5,8	6,8	N99C
45.12	2,5	1,9	3,0	V102C
45.13	16,5	1,9	2,6	E30C
45.14	4,4	1,5	2,0	S100C

Ejemplo 49

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 3-4 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 mediante el uso de cinco niveles de dosis del compuesto 45.4 a partir de 1-150 nmol/rata.

5 Los niveles basales de IGF-1 en plasma en ratas Sprague Dawley con remoción quirúrgica de la hipófisis fueron aproximadamente 80-100 ng/ml en todos los grupos de dosificación. Después de una dosis única, los niveles de IGF-1 aumentaron rápidamente a 800-1000 ng/ml en el Día 1 casi independientemente de la dosis. Los niveles en plasma de IGF-1 disminuyeron nuevamente durante los días siguientes de una manera dependiente de la dosis con la disminución más rápida observada con la menor dosis y la menor disminución con la dosis más alta. A la dosis más alta, el nivel en plasma de IGF-1 se mantuvo a 800-900 ng/ml durante 3 días antes de que comenzara a disminuir más rápidamente. Los niveles de concentración en plasma de IGF-1 se elevaron en comparación con el grupo de control con vehículo para todos los grupos de dosificación hasta el Día 3. Para los grupos de dosificación se elevaron 10 nmol, 50 nmol y 150 nmol durante todo el estudio (7 días).

Ejemplo 50

15 Desaparición

Se plantea la hipótesis de que la velocidad de absorción se relaciona con la capacidad de una molécula para atravesar las uniones estrechas de los capilares subcutáneos, una propiedad relacionada con el tamaño molecular. Un PEG-hGH con un PEG de 40 kDa tiene un peso molecular aparente (mw) de 150 – 250 kDa. Una molécula de hGH con albúmina unida covalentemente tiene un mw = 87 kDa, mientras que una molécula de hGH con una albúmina unida no covalentemente se disociará de la parte de albúmina en el tiempo y por lo tanto tendrá un mw = 22 kDa. La cantidad de tiempo en el estado disociado dependerá de la afinidad del resto de unión por la albúmina. Por lo tanto, la velocidad de absorción de tales compuestos debería ser más rápida que para PEG-hGH y la velocidad debería aumentar con el uso de restos de unión a albúmina que tienen menor afinidad por albúmina.

Las soluciones de prueba se diluyeron en tampón estándar que consiste en: Glicina 20 mg/ml, manitol 2 mg/ml, NaHCO₃ 2,4 mg/ml, con ajuste del pH a 8,2.

30 La yodinación con 125I se realizó por Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S. La formulación radioactiva final tuvo una actividad radioactiva específica de 3 µCi/ml y se suministró en Penfills de 3 ml.

Las soluciones se almacenaron a 2-8 °C hasta su uso.

35 La velocidad de desaparición para los compuestos seleccionados se midió en cinco cerdos hembra de LYD cruzados. 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.

40 Los animales se dosificaron (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 fue de 5 mm.

45 La desaparición de los depósitos radioactivos se midió mediante un equipo portable durante aproximadamente 24-48 horas.

Para cada animal individual, los resultados se presentaron como AUC (0-45 hrs) como se muestra en la tabla 5.

50 La potencia *in vitro*, las vidas medias y características adicionales de una serie de compuestos se determinaron como se describió anteriormente y se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características del compuesto.

Compuesto	Potencia <i>in vitro</i>	T _½ (i.v. Rata) (hora)	AUC de desaparición (0-45 hora)	Duración de IGF-1 aumento (hora)
hGH	1,0 (def)	0,23	519	-
44.9	8,2	4,2	2259	>48
44.8	1,8	2,6	1490	>24
44.1	4,7	5,6	1750	>48
44,3	1,5	1,3	2152	<24

44.6	4,7	3,2	1558	<24
44.7	4,5	3,8	2039	<24
44.5	5,8	4,1	1599	>48
44.4	3,9	2,5	1588	>48

10 Ejemplo 51

Estudio in vivo en cerdos

15 Para confirmar adicionalmente la funcionalidad de los conjugados de albúmina de hGH de acuerdo con la invención se seleccionaron tres compuestos para estudios farmacocinéticos adicionales en cerdos. Se prepararon compuestos iguales a los compuestos 44.1, 44.4 y 44.5 mediante la conjugación del grupo de unión a la albúmina a la variante de hGH después de la eliminación de la etiqueta de purificación MAEA.

20 Los compuestos de prueba se diluyeron a la concentración final de 100 nmol/ml en tampón estándar (20 mg/ml de glicina, 2 mg/ml de manitol, 2,4 mg/ml de NaHCO₃, pH ajustado a 8,2). En el estudio se usaron veinticuatro minicerdos Göttingen machos de 5 meses de edad y con un peso de 9-12 kg. Cada compuesto de prueba se dosificó a ocho animales con cuatro minicerdos que recibieron administración del bolo intravenosa y cuatro animales que recibieron administración subcutánea. Las inyecciones intravenosas se administraron a través de un Venflon de 24 G en la oreja. La dosis se proporcionó como un bolo durante 5 segundos máximo seguido de 2 ml de NaCl al 0,9 %. Las inyecciones subcutáneas se administraron en el lado derecho del cuello, aproximadamente a 5-7 cm de la oreja y a 7-9 cm del centro del cuello. Cada animal recibió una única dosis del compuesto de prueba de 10 nmol/kg. Se recolectaron muestras de sangre de cada animal en los siguientes puntos de tiempo: Predosis, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, y 336 horas después de la inyección. El plasma se aisló de cada muestra de sangre y se almacenó a -20 °C antes de analizarse para el compuesto de prueba. Los datos de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un método farmacocinético no compartimental.

Tabla 6. Estimados de los parámetros farmacocinéticos después de la administración subcutánea de dosis única de 10 nmol/kg.

Compuesto	ABW-Halo como en	AUC/dosis (h*kg/l)	T _½ (h)	MRT (h)	MAT (h)	F (%)
51.1	44.1	139 (37,5)	11 (1,2)	30,6 (4,1)	10,0	38,6
51.2	44.5	101 (22,5)	12 (2,7)	25,2 (3,9)	11,6	60,8
51.3	44.4	144 (34,7)	12,6 (3,5)	33,1 (1,7)	12,1	35,6

Media ± SD en ()

45 La Tabla 6 muestra parámetros farmacocinéticos claves para los tres compuestos de prueba. La AUC/Dosis es un estimado para la exposición corregida de la dosis de los compuestos de prueba. T_½ es la vida media terminal de los compuestos de prueba después de que la fase de absorción se ha completado. MRT es el tiempo de residencia promedio de los compuestos de prueba que corresponde al tiempo promedio que la molécula del compuesto de prueba está en el cuerpo. MAT es el tiempo de absorción promedio correspondiente y es un estimado del tiempo promedio que la molécula está en la fase de absorción. F es la biodisponibilidad absoluta de los compuestos de prueba en relación con la administración intravenosa.

Listado de secuencias

55 <110> Novo Nordisk A/S
Behrens, Carsten
Buchardt, Jens
Nørskov-Lauritsen, Leif
60 Andersen, Henrik S
Johansen, Nils L

<120> HORMONAS DE CRECIMIENTO CON EFICACIA PROLONGADA IN VIVO

65 <130> 8069.204-WO

ES 2 745 484 T3

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 1

15	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	1				5					10					15	
20	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu				20					25					30		
25	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro				35					40					45		
30	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg				50					55					60		
35	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu															80	
40	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val					85					90					95	
45	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp																110
50	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu																125
55	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser																140
60	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr																160
	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe																
																					165										175	
	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe																	
																					180										190	

REIVINDICACIONES

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

5 A-W-B-GH (I)

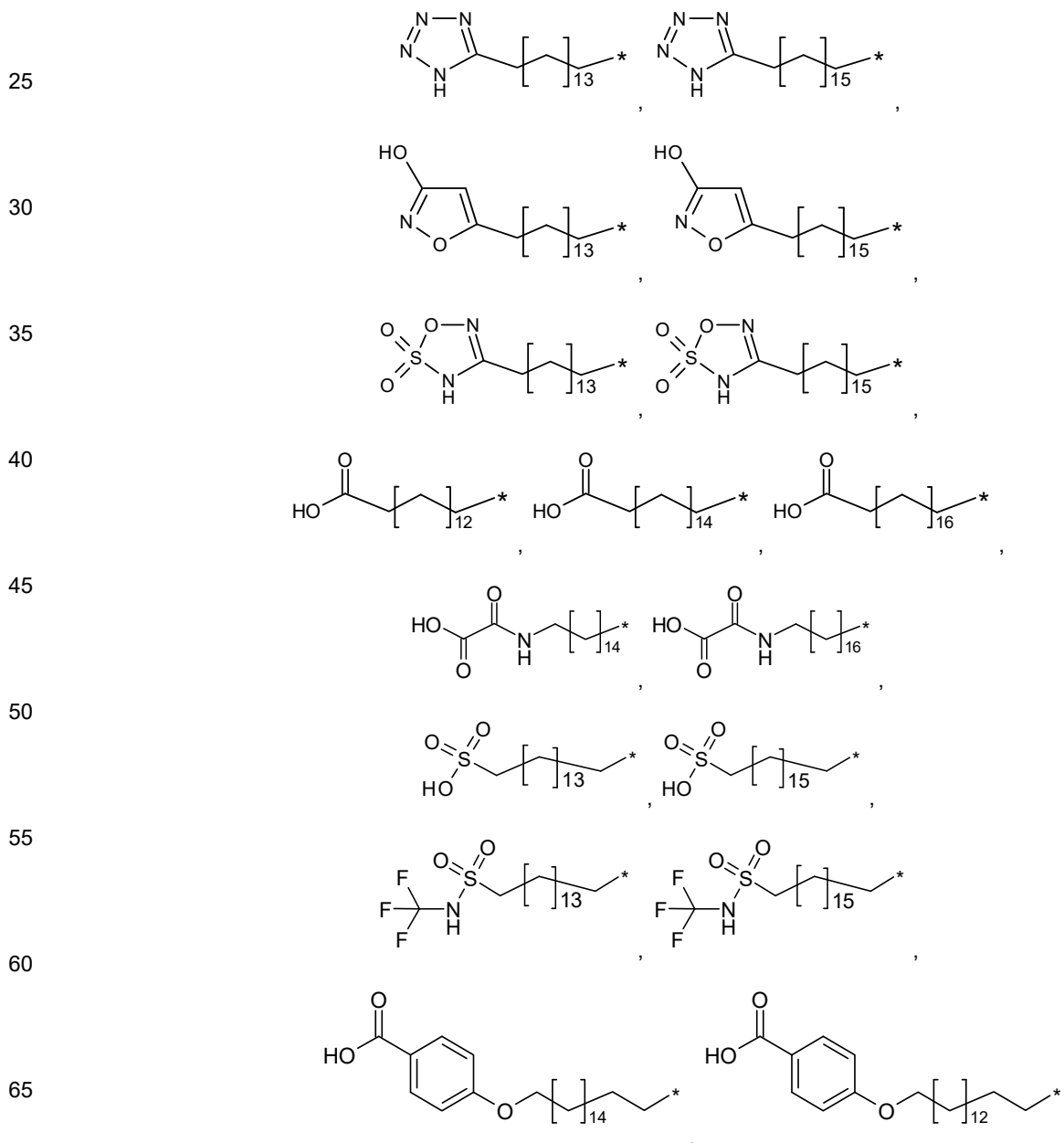
en donde

10 GH representa un compuesto de la hormona de crecimiento que tiene una única mutación de Cys seleccionada del grupo de mutaciones correspondientes a; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C y G190C de hGH (SEQ ID NO: 1)

15 B representa un espaciador hidrofílico,

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

20 A representa un residuo de unión a la albúmina seleccionado de



en donde * indica la unión a B a través de W

en donde el residuo de unión a la albúmina (A) a través de un espaciador hidrofílico (B) se une a GH a través del residuo de azufre de la única mutación de Cys, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 5
2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde la mutación única de Cys se selecciona de cualquiera de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO:1).
- 10
3. El conjugado de la reivindicación 1, en donde la mutación única de Cys se selecciona de cualquiera de; E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C y G126C de hGH (SEQ ID NO:1).
- 15
4. El conjugado de la reivindicación 1, en donde la mutación única de Cys es L101C.
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-4, donde la GH tiene un puente disulfuro adicional.
- 20
6. El conjugado de la reivindicación 5, en donde la GH tiene un puente disulfuro adicional entre al menos uno de los pares de aminoácidos en las posiciones correspondientes a R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C y/o V185C/S188C en hGH (SEQ ID NO: 1).
- 25
7. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 5 y 6, en donde al menos una de las cisteínas del enlace disulfuro adicional está presente en un segmento bucle, tal como de los residuos de aminoácidos 128-154 (L3).
- 30
8. El conjugado de la reivindicación 7, en donde el enlace disulfuro adicional conecta L3 con la hélice 2.
9. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-8, en donde la GH tiene al menos 95 % de identidad con hGH (SEQ ID NO:1).
- 35
10. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde W tiene la fórmula



40 en donde

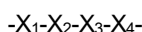
Y es $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquil- W_8 - o un enlace de valencia,

I7 es 0-6,

45 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 s_3 es 0 o 1,

50 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 s_4 es 0 o 1.

55 11. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde B tiene la fórmula



en donde

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

65 X_4 es $F-D1-(CH_2)_6-D2-$,

5 I1, I2, I3, I4, I5 e I6 se seleccionan independientemente de 0-16, tal como de 0-6 m1, m3, m4, m6 y m7 se seleccionan independientemente de 0-10, tal como de 0-6 m2 y m5 se seleccionan independientemente de 0-25, tal como de 0-10 n1, n2, n3 y n4 se seleccionan independientemente de 0-16, tal como de 0-10 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,

10 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 o -OH,

15 D1, D2, E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O-, -N(R₆)-, -N(C(O)R₇)- o un enlace de valencia; en donde R₆ y R₇ representan independientemente hidrógeno o C₁₋₆-alquilo, W₁ a W₅ 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,

20 W₆ se selecciona 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)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo, -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde s1 es 0 o 1 y el grupo C₁₋₆-alquilo se sustituye opcionalmente con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH;

en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

25 12. El conjugado de la reivindicación 11, en donde D1 y D2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

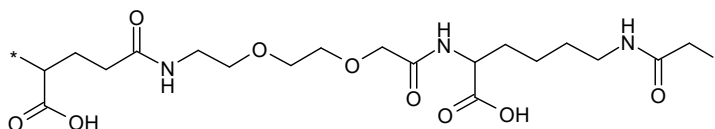
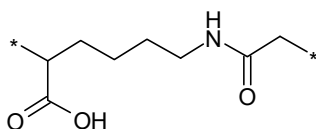
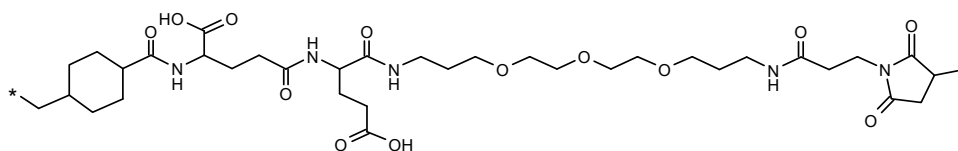
30 13. El conjugado de la reivindicación 11 o 12, en donde E1 y E2 se seleccionan independientemente de -O- o -N(R⁶)- o un enlace de valencia.

35 14. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde W1 a W8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-alquilo o -C(O)NHC₁₋₆-alquilo o un enlace valencia; en donde el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con oxo, pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH; en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a X₄.

40 15. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente 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 o -S(O)₂OH.

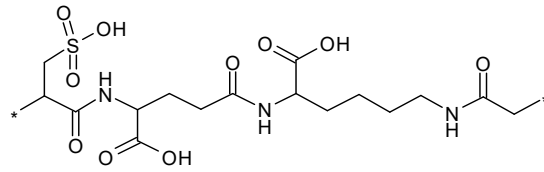
45 16. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde X₄ es un enlace de valencia y W₆ se selecciona de pirrolidina-2,5-diona, -NHC(O)CH*CH₂COOH o -NHC(O)CH₂CH*COOH en donde (*) indica el punto de unión del átomo de carbono de CH a GH.

50 17. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en donde B se selecciona de

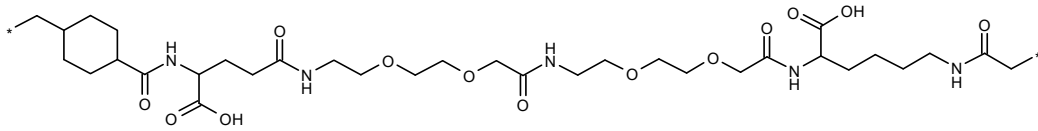


65

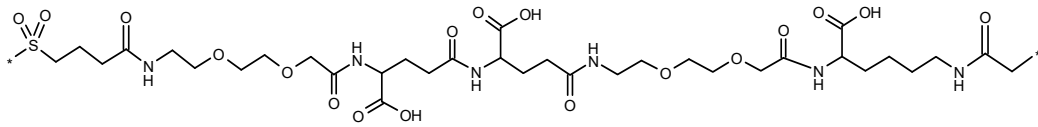
5



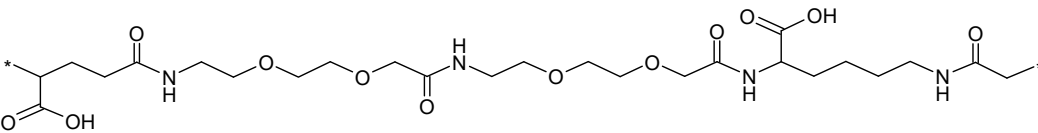
10



15

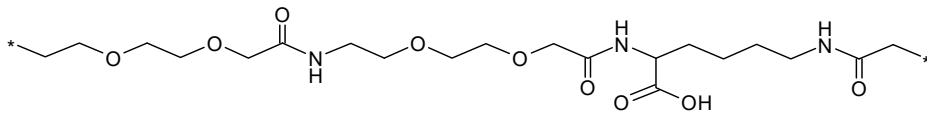


20

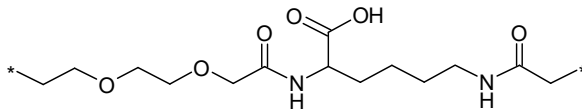


25

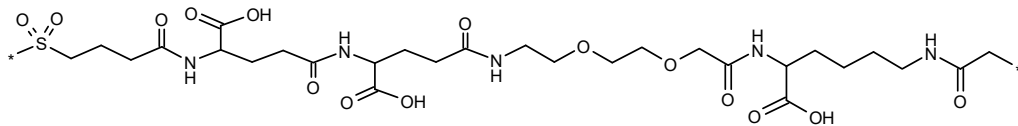
30



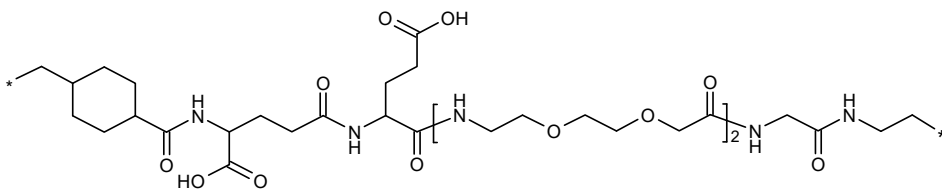
35



40

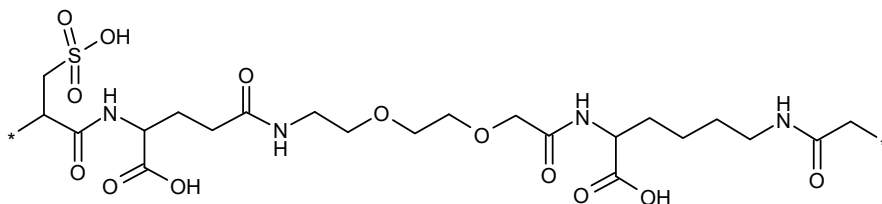


45



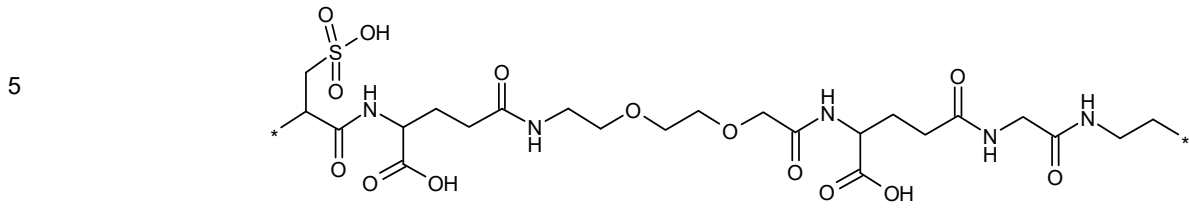
50

55

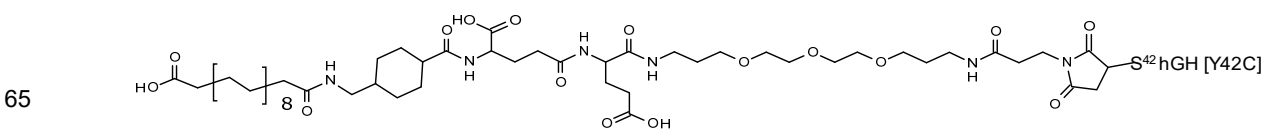
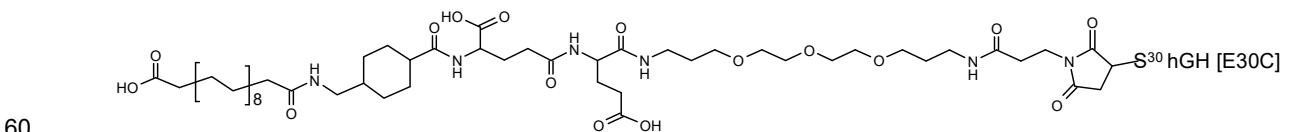
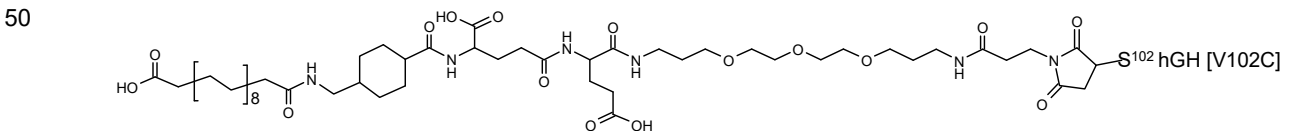
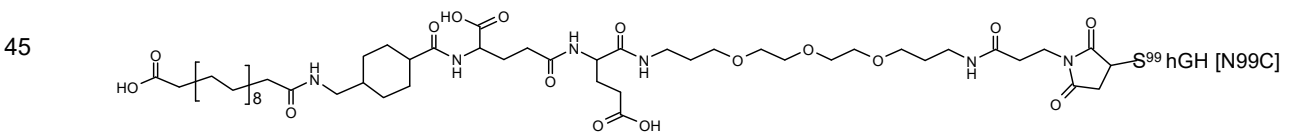
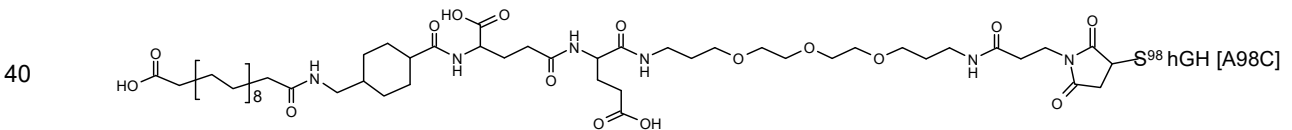
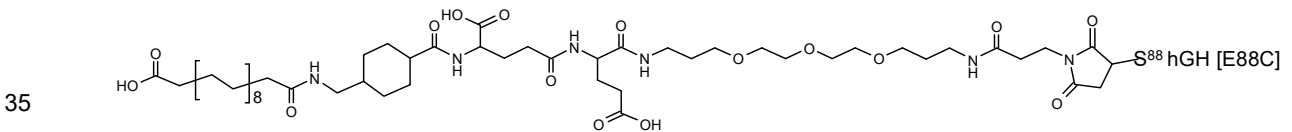
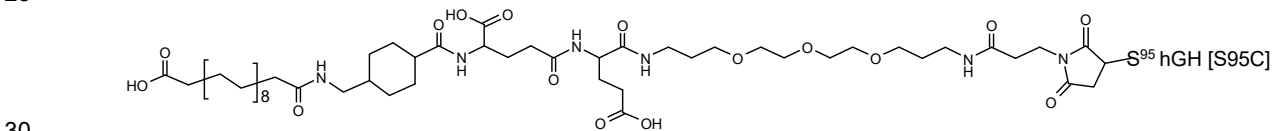
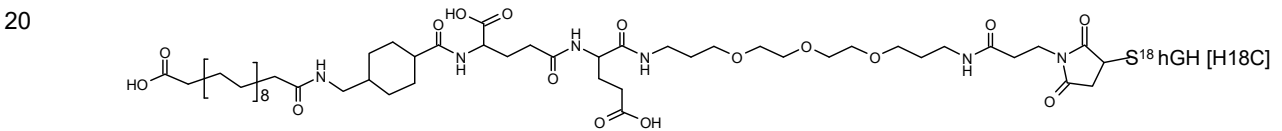
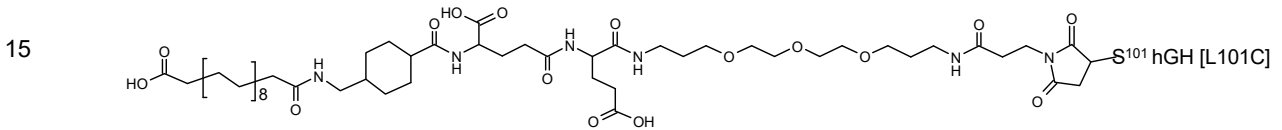


60

65

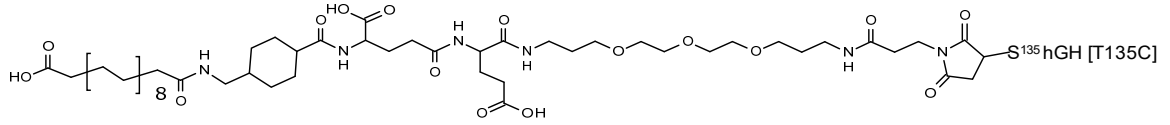


18. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicho conjugado se selecciona de

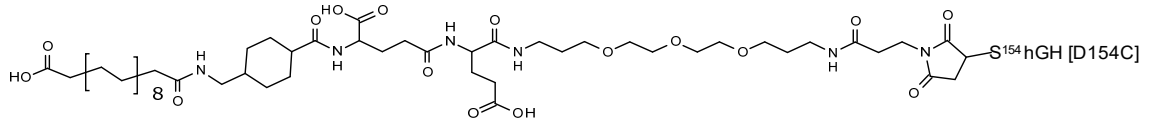


ES 2 745 484 T3

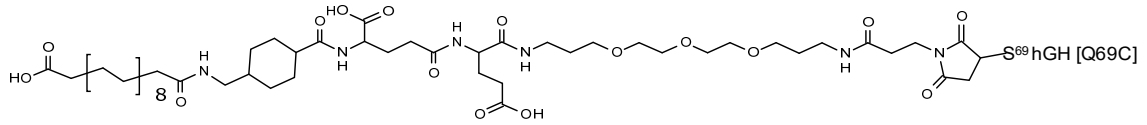
5



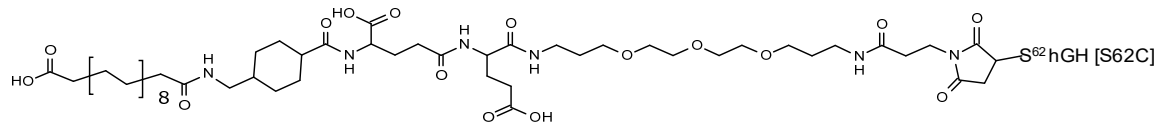
10



15

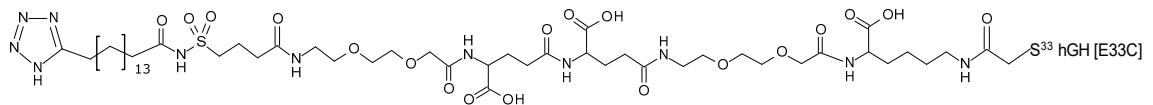


20

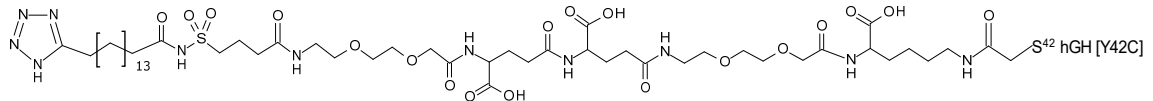


25

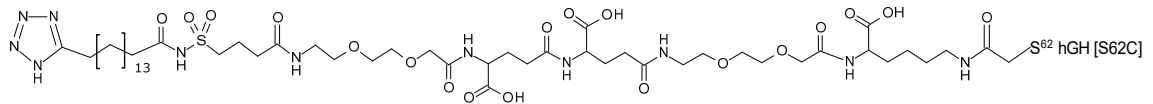
30



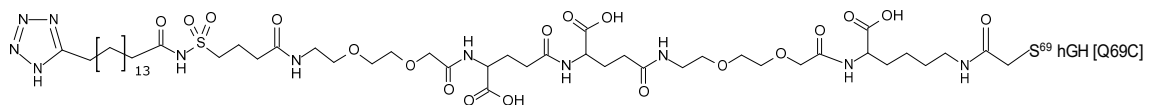
35



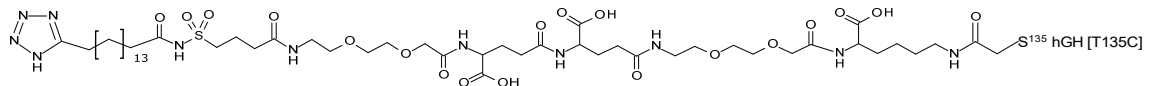
40



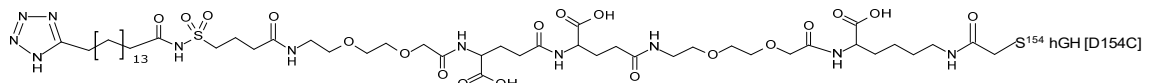
45



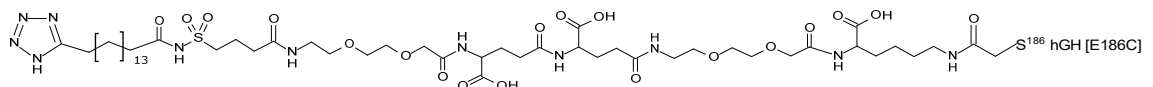
50



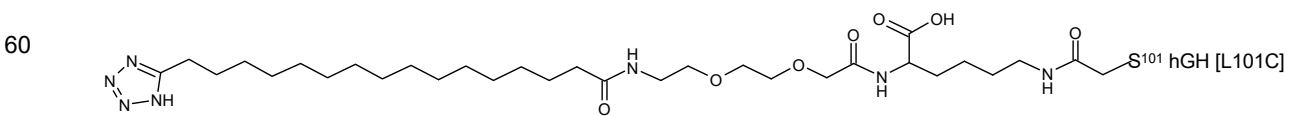
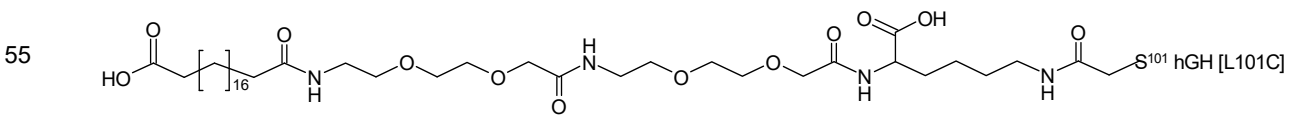
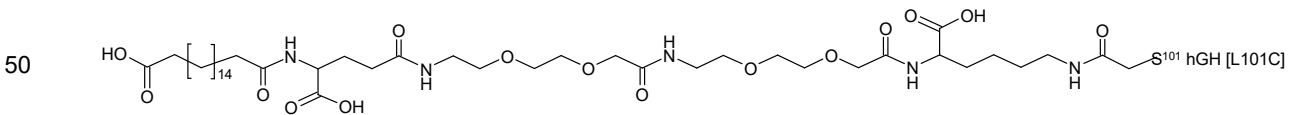
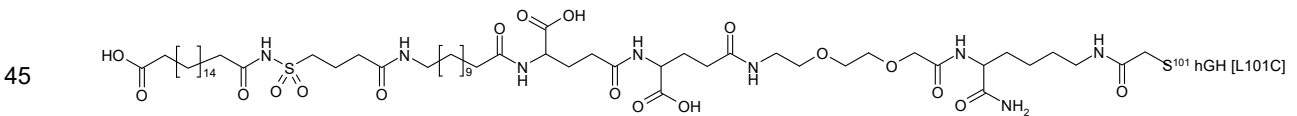
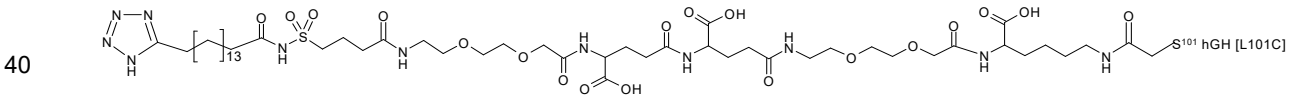
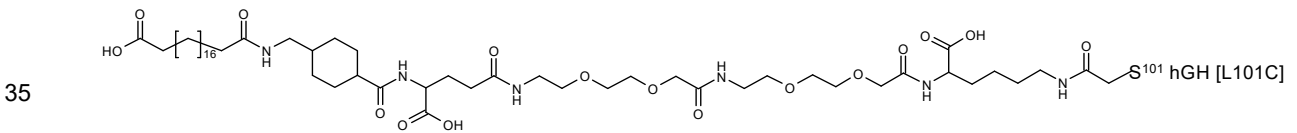
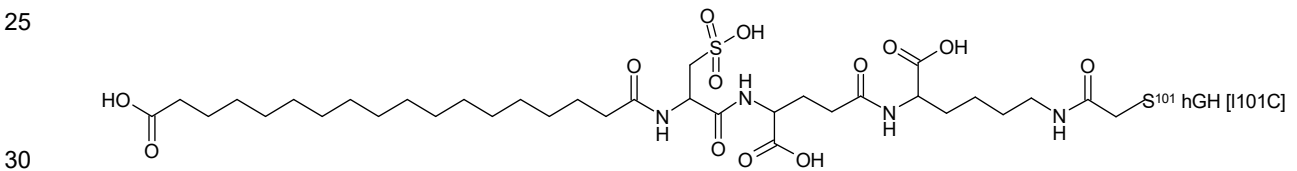
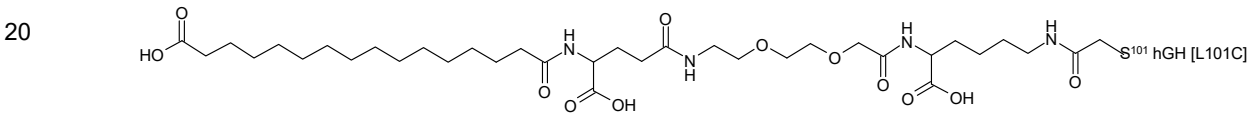
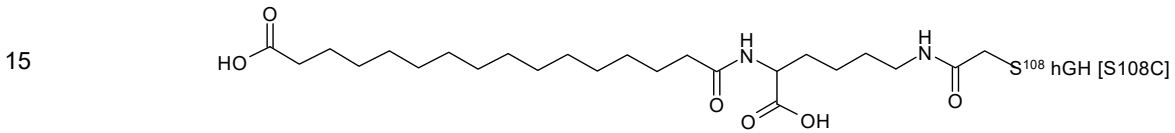
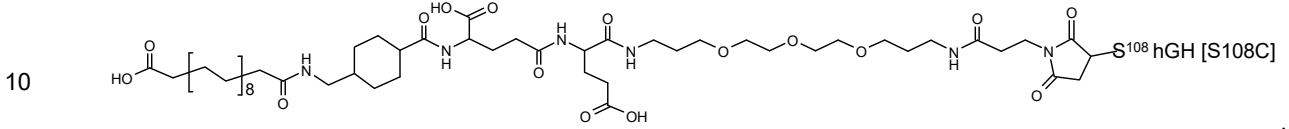
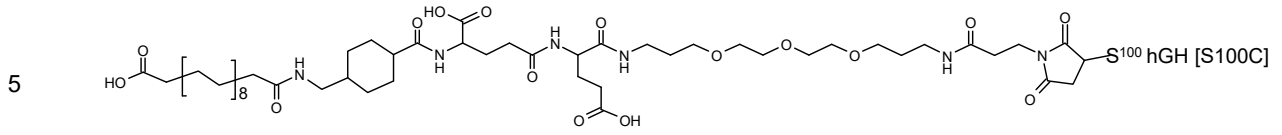
55



60

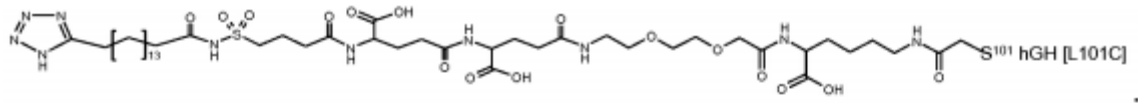


65

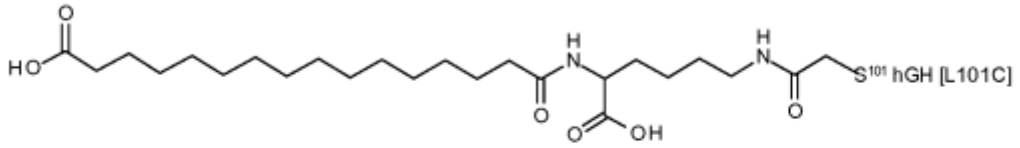


65

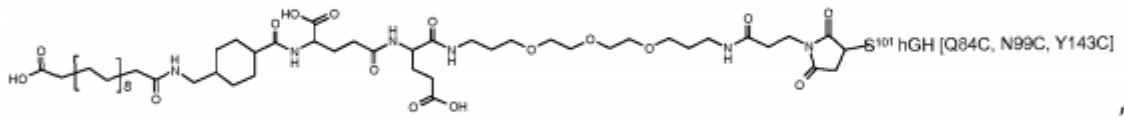
5



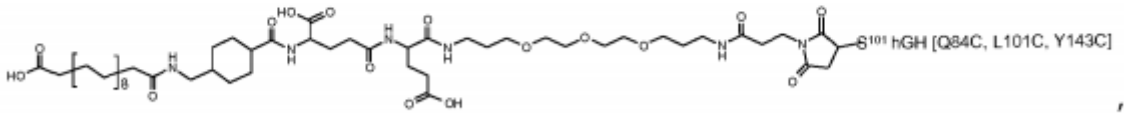
10



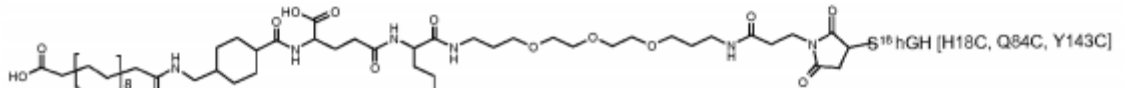
15



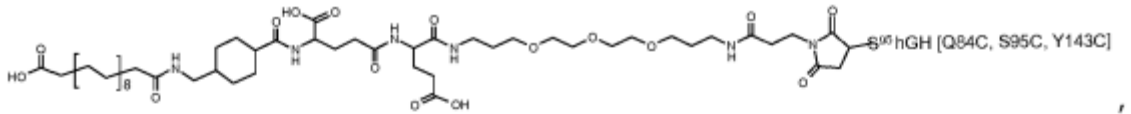
20



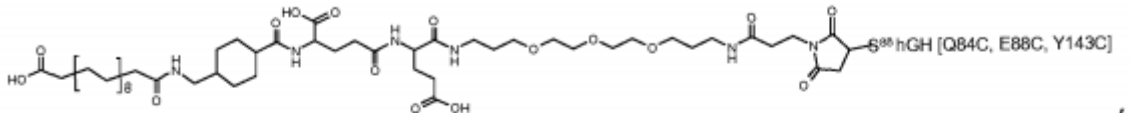
25



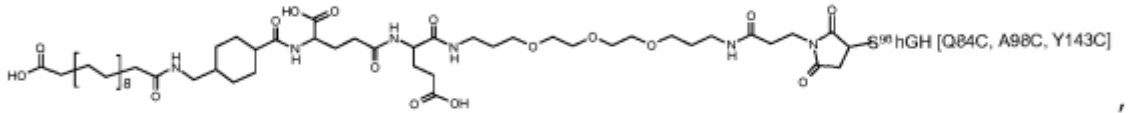
30



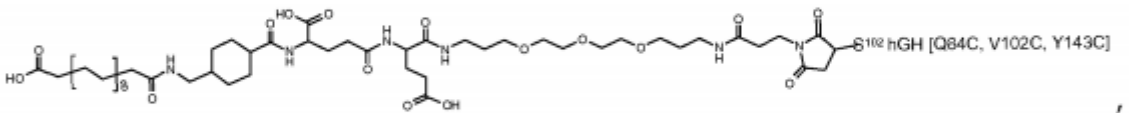
35



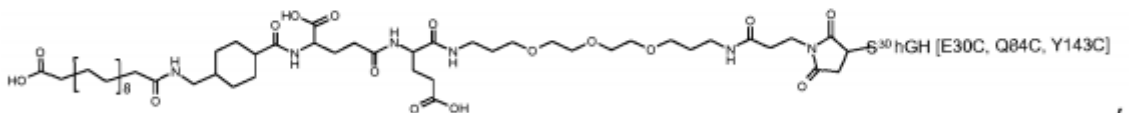
40



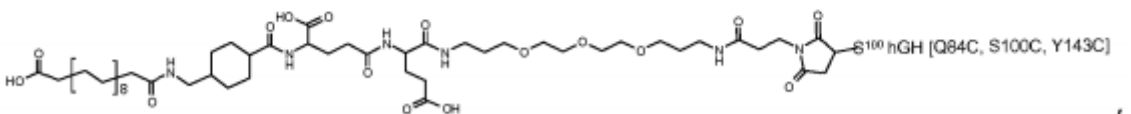
45



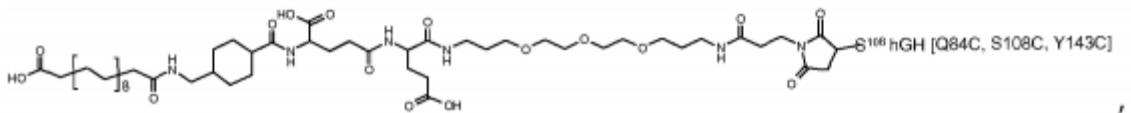
50



55

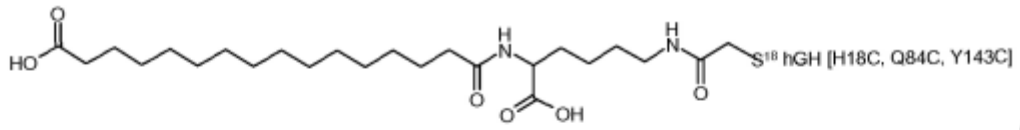


60

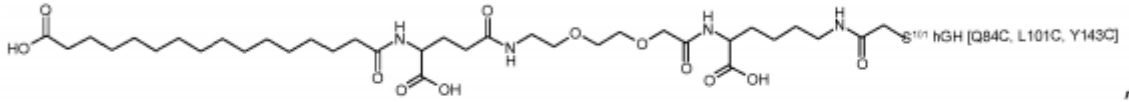


65

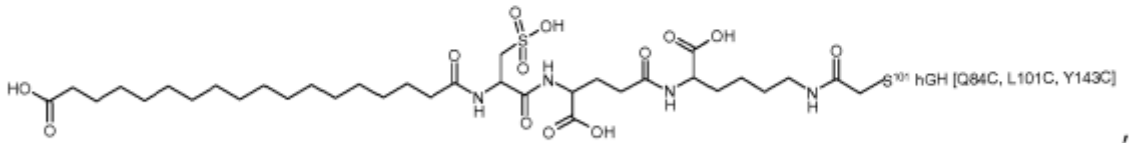
5



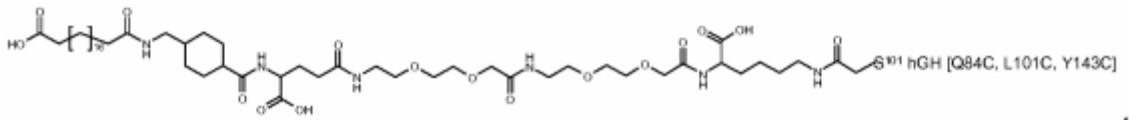
10



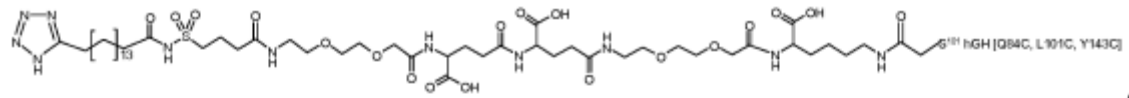
15



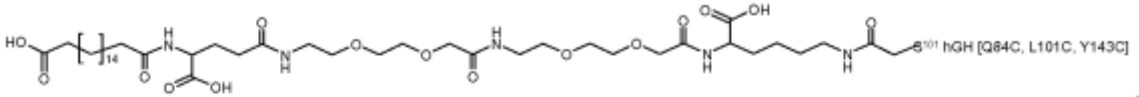
20



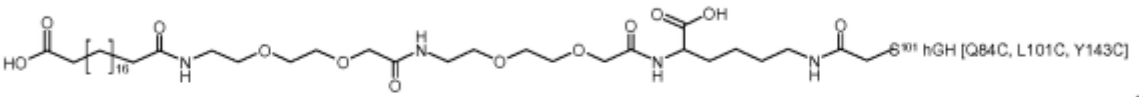
25



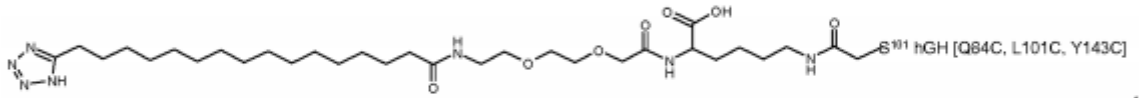
30



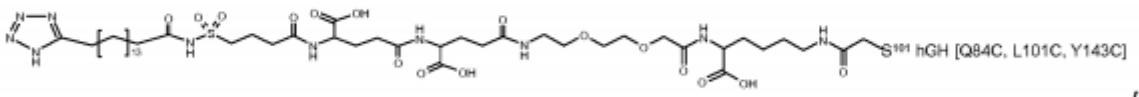
35



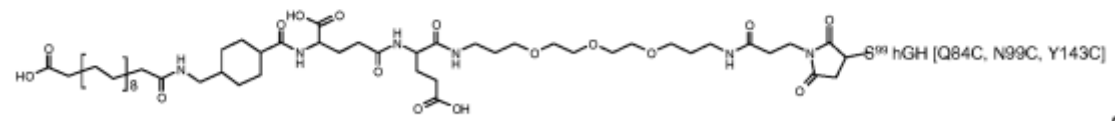
40



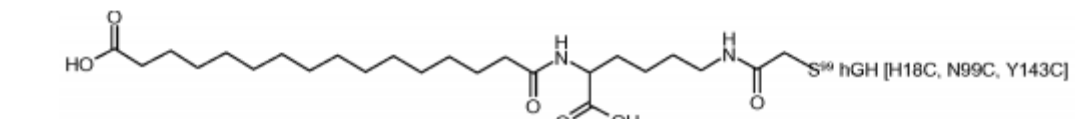
45



50



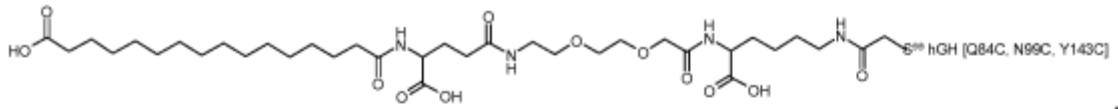
55



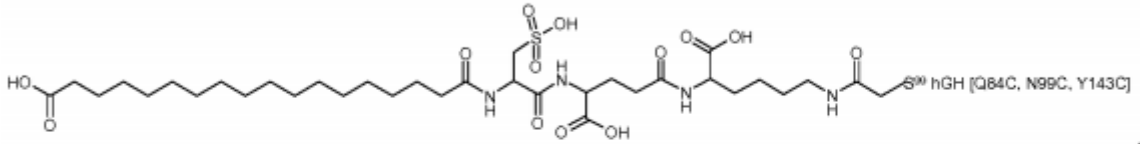
60

65

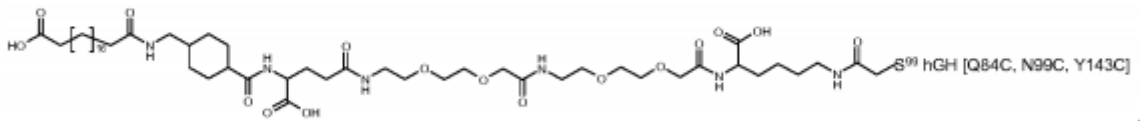
5



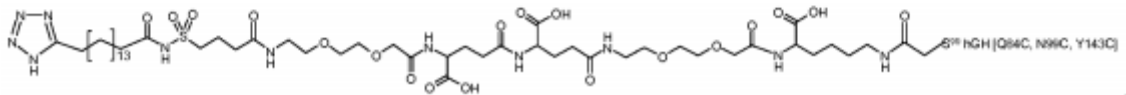
10



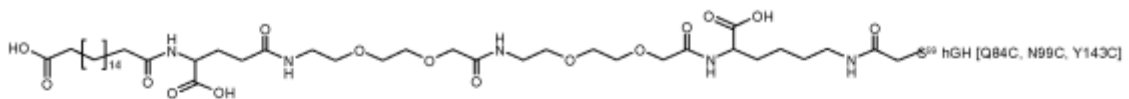
15



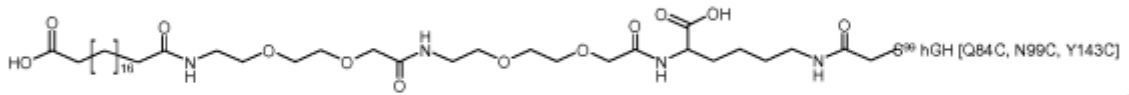
20



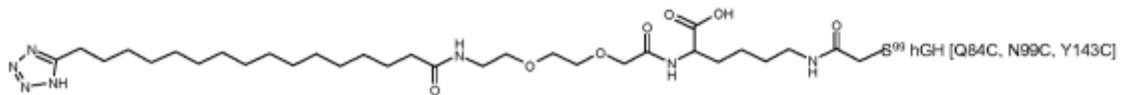
25



30



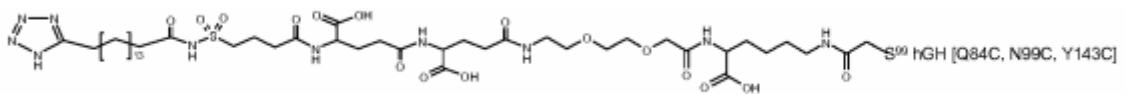
35



40

y

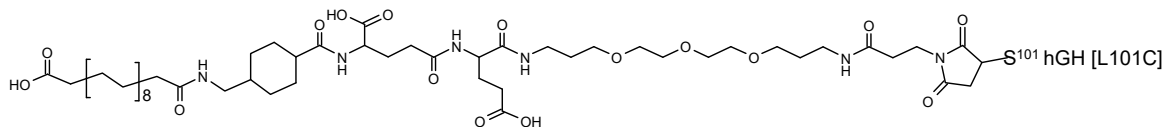
45



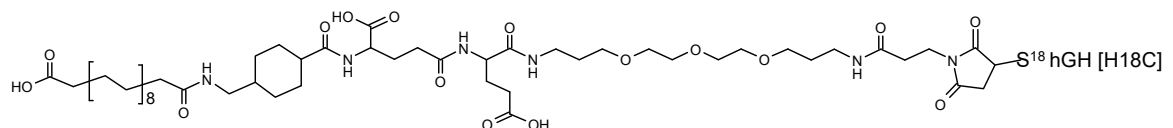
50

19. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicho conjugado se selecciona de

55

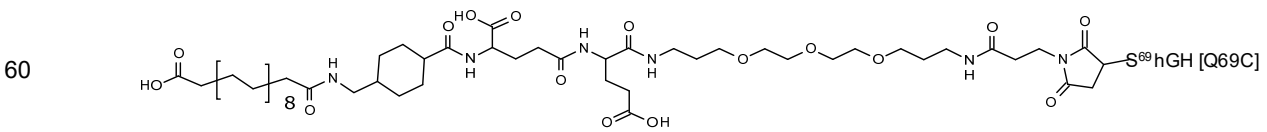
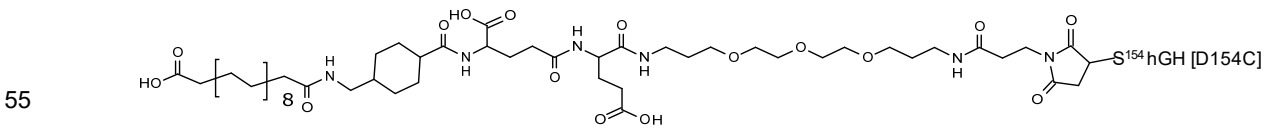
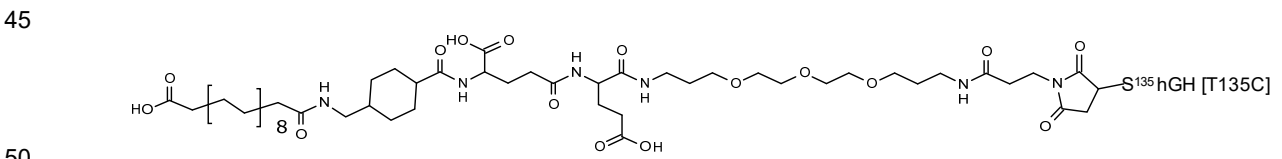
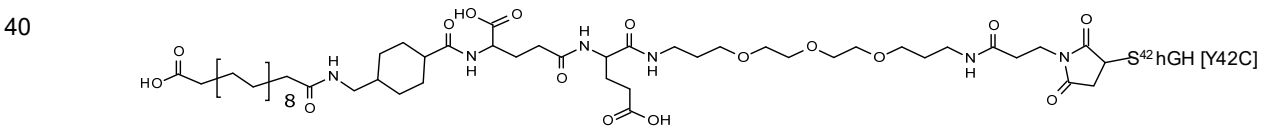
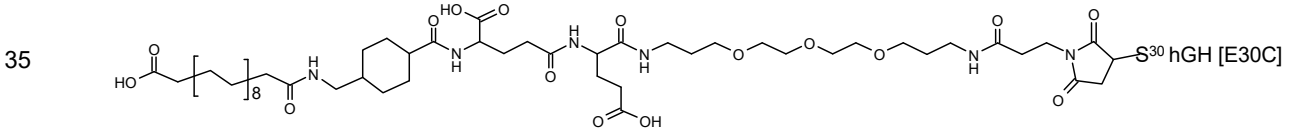
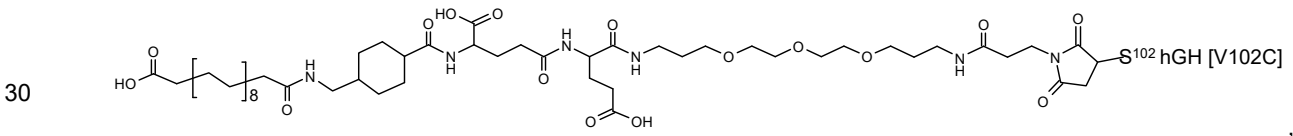
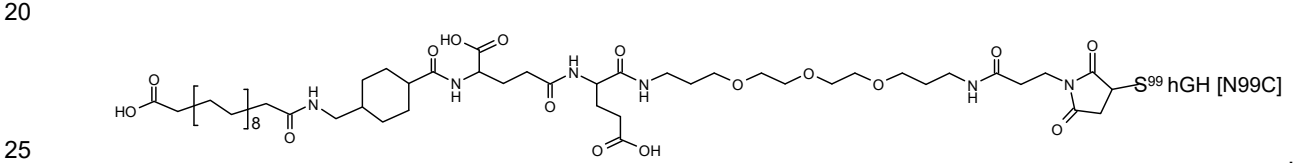
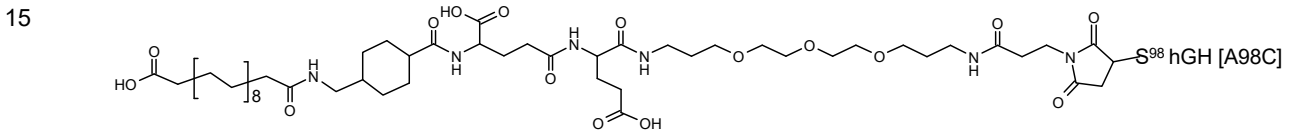
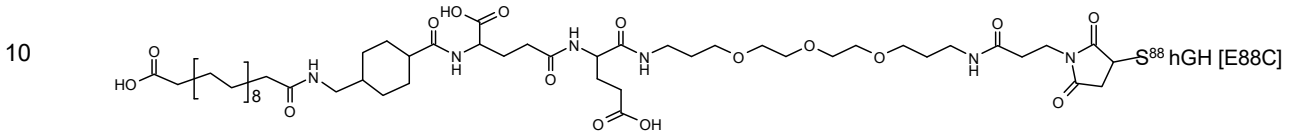
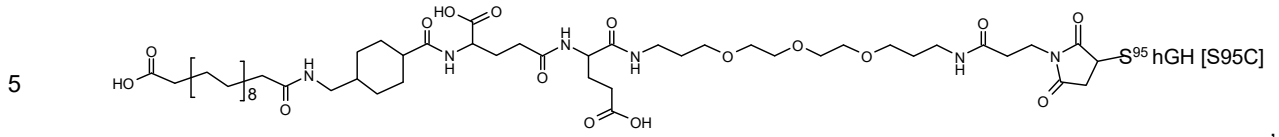


60



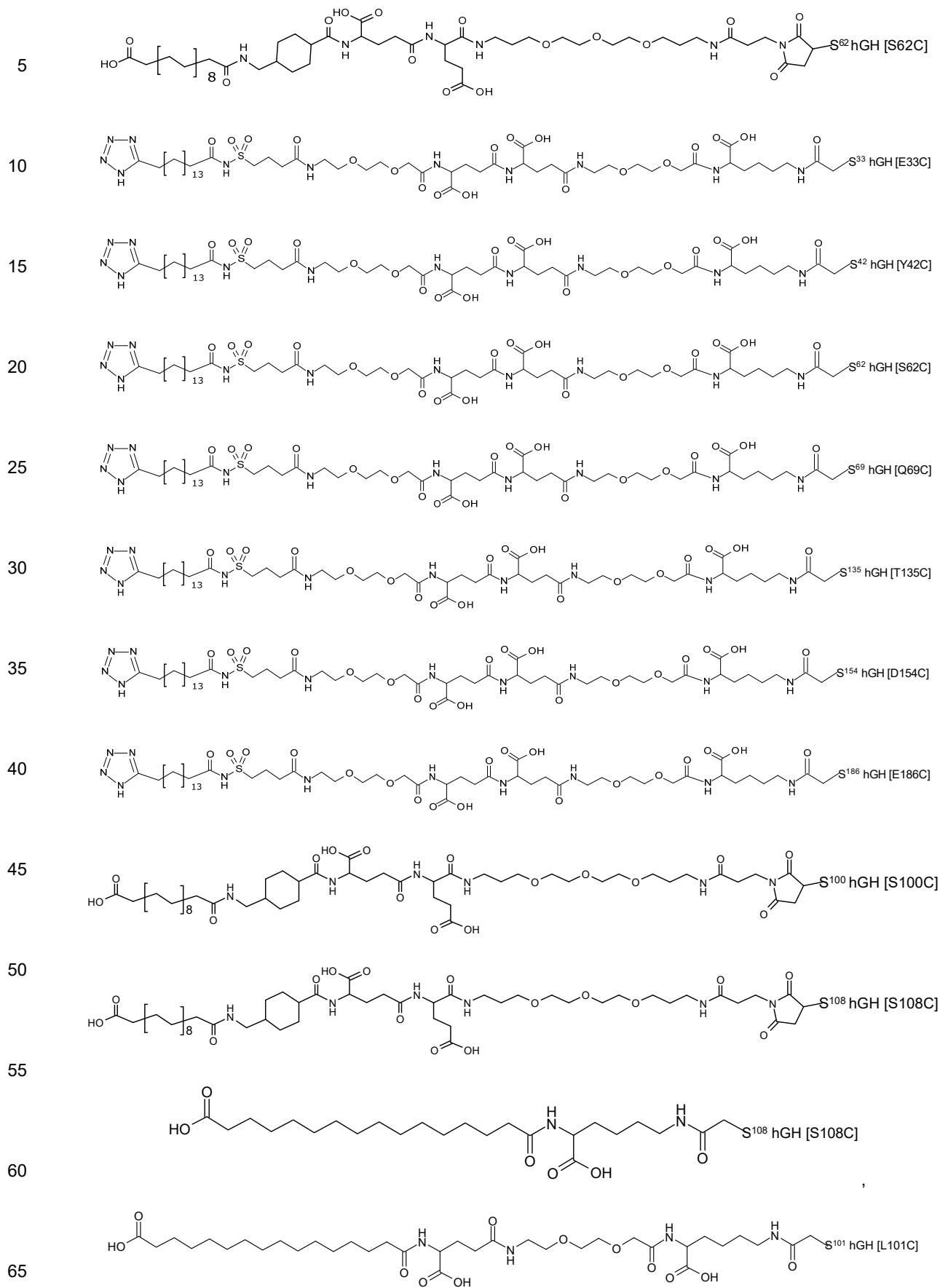
65

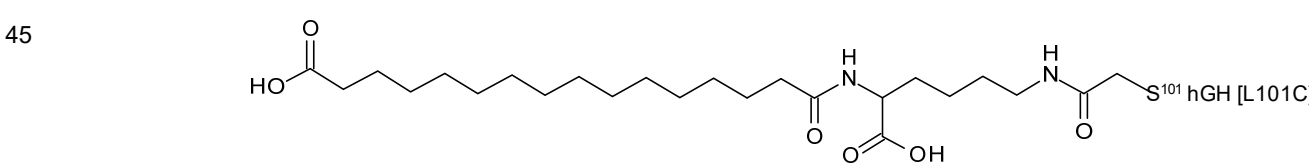
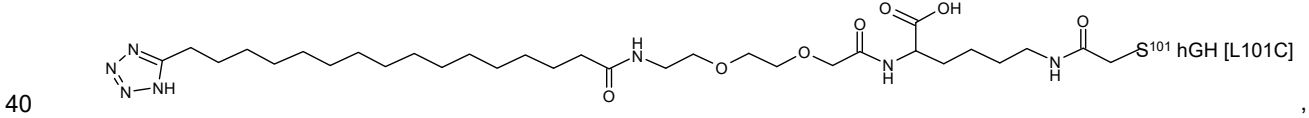
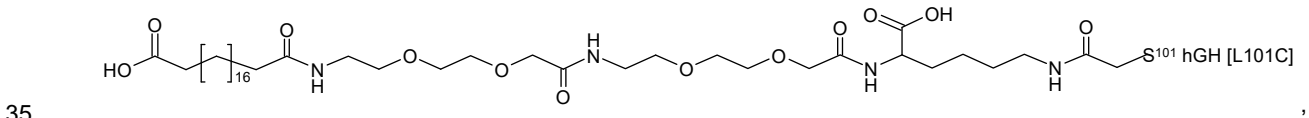
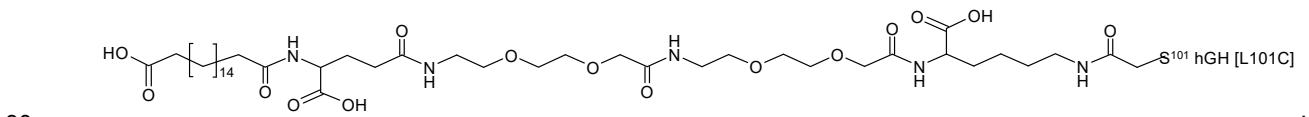
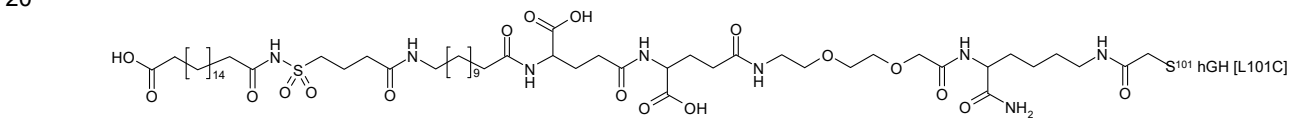
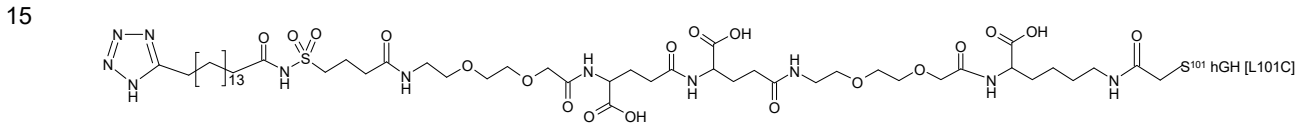
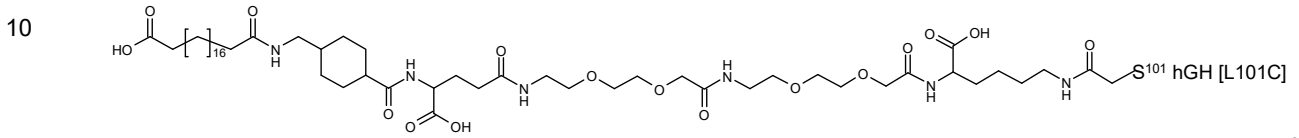
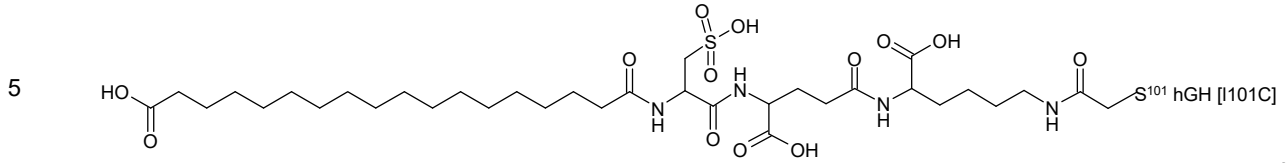
ES 2 745 484 T3



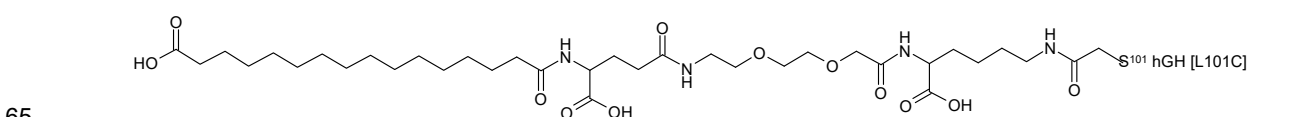
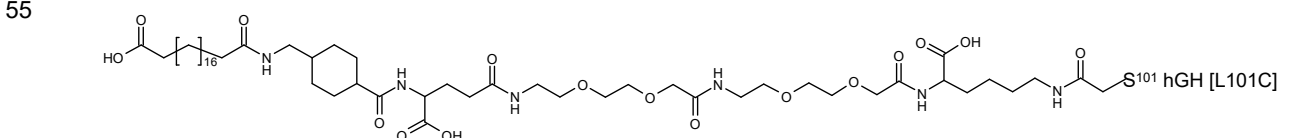
65

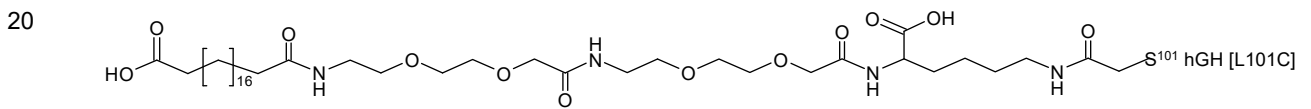
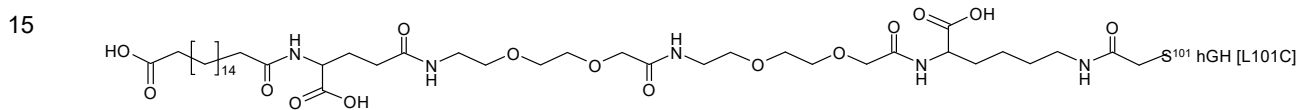
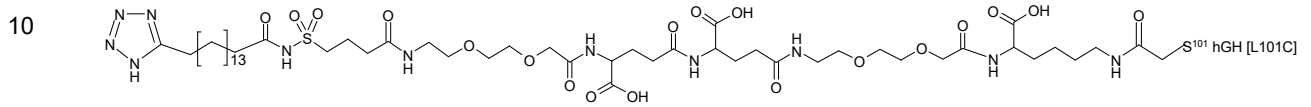
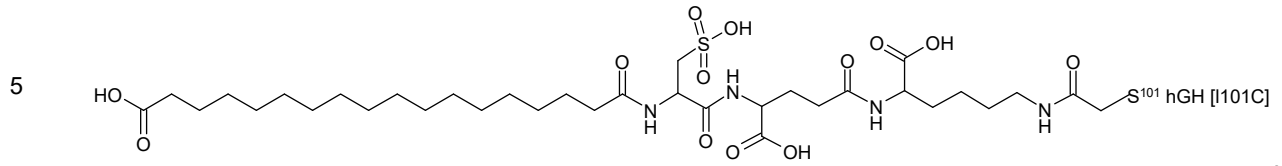
ES 2 745 484 T3





20. El conjugado de la reivindicación 1, en donde dicho conjugado se selecciona de





25
y

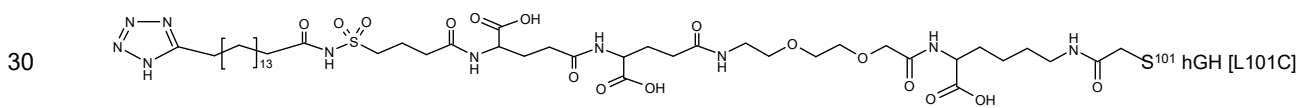


Figura 1

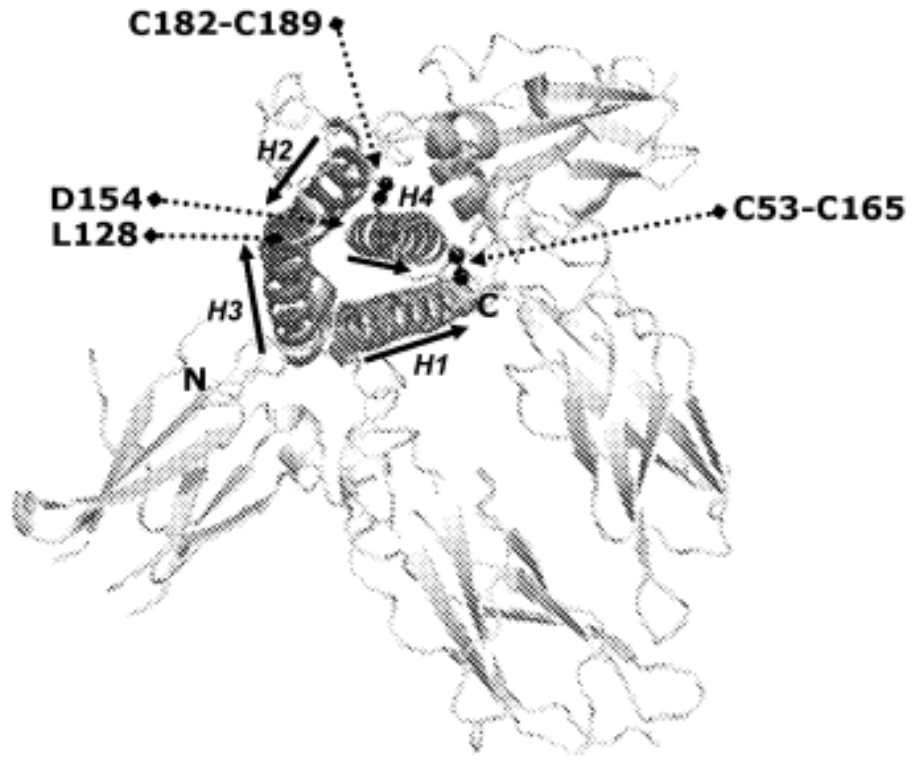


Figura 2

```

1   FPTIPLSRLE DNAMLRARHL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSES IPT
      H1                                     L1
61  PSNREETQOK SNLELRISL LLIQSNLEPY QFLRSVFANS LVGASDSNV YDLLKDLEEG
      H2                                     L2                                     H3
121 IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKFDTNS HNDDALLKHY GLLYCFRKM DKVETFLRIV
      L3                                     H4
181 QCRSVEGSCG F
    
```