



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012018116-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 24/01/2011**

**(45) Data de Concessão: 21/06/2022**

---

**(54) Título:** CONJUGADOS DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO COM EFICÁCIA IN VIVO PROLONGADA

**(51) Int.Cl.:** A61K 47/48; A61P 5/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 22/01/2010 US 61/297,305; 22/01/2010 EP 10151405.7.

**(73) Titular(es):** NOVO NORDISK HEALTH CARE AG.

**(72) Inventor(es):** CARSTEN BEHRENS; NILS LANGELAND JOHANSEN; HENRIK SUNE ANDERSEN; LEIF NØRSKOV-LAURITSEN; JENS BUCHARDT.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2011050923 de 24/01/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/089255 de 28/07/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 20/07/2012

**(57) Resumo:** HORMÔNIOS DO CRESCIMENTO COM EFICÁCIA IN VIVO PROLONGADA. A presente invenção refere-se a compostos de hormônio do crescimento com um perfil prolongado. O efeito é obtido ligando um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico a variantes de hormônio do crescimento. São ainda descritos métodos de preparação e uso de tais compostos. Esses compostos de hormônio do crescimento são baseados em três perfis alterados considerados particularmente úteis em terapia.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"CONJUGADOS DE HORMÔNIO DO CRESCIMENTO COM  
EFICÁCIA *IN VIVO* PROLONGADA".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção se refere a um composto de hormônio do crescimento ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico e a métodos de preparação e uso de tais compostos. Esses conjugados de hormônio do crescimento têm resistência aumentada à degradação proteolítica em combinação com um perfil de ação prolongado e são úteis em terapia.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] O hormônio do crescimento é um hormônio polipeptídeo secretado pela pituitária anterior em mamíferos. Dependente da espécie o hormônio do crescimento é uma proteína composta de aproximadamente 190 resíduos de aminoácido correspondendo a um peso molecular de aproximadamente 22 kDa. O hormônio do crescimento se liga a e sinaliza através de receptores de superfície celular, os receptores de hormônio do crescimento (GHR). O hormônio do crescimento desempenha um papel-chave em promoção de crescimento, manutenção da composição do corpo normal, anabolismo e metabolismo de lipídeo. Ele também tem efeitos diretos sobre metabolismo de intermediário, tal como absorção de glicose diminuída, lipólise aumentada, absorção de aminoácido aumentada e síntese de proteína. O hormônio também exerce efeitos sobre outros tecidos incluindo tecido adiposo, fígado, intestino, rim, esqueleto, tecido conectivo e músculo. Hormônio do crescimento humano recombinante (hGH) tem sido produzido e está comercialmente disponível como, por exemplo: Genotropin® (Pharmacia Upjohn), Nutropin® e Protropin® (Genentech), Humatrope® (Eli Lilly), Serostim® (Serono), Norditropin (Novo Nordisk), Omnitrope (Sandoz), Nutropin

Depot (Genentch e Alkermes). Ainda, um análogo com um resíduo metionina adicional na extremidade N-terminal também é comercializado como, por exemplo: Somatonorm<sup>®</sup> (Farmacia Upjohn/Pfizer).

[0003] O hormônio do crescimento compartilha uma topologia comum com os outros membros da família de hormônio do crescimento de proteínas, Prolactina (PRL) e Lactogênio Placentário (PL). O hormônio do crescimento é classificado como uma proteína de feixe de quatro hélices (figura 1) exibindo uma topologia "up-up-down-down" com duas ligações dissulfeto conservadas. Especificamente, o hormônio do crescimento humano do tipo selvagem (hGH) é composto de 191 resíduos de aminoácido e tem quatro resíduos cisteína nas posições 53, 165, 182 e 189, o que estabiliza a estrutura tridimensional da proteína através da formação de duas ligações dissulfeto intramoleculares conectando C53 com C165 e C182 com C189, respectivamente (figura 1). A estrutura de hGH foi experimentalmente determinada através de cristalografia de raio-X na forma livre (Chantalet, L. e outros *Protein e Peptide Letters* **3**, 333-340, (1995)) e em complexo com sua proteína de ligação (o domínio extracelular do GHR humano (hGHR)) (Devos, A. M. e outros, *Science* **255**, 306-312, (1992)). Essas estruturas foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) e estão publicamente disponíveis (códigos de acesso PDB 1HGU e 1HWG, respectivamente). Desta maneira, a partir das estruturas de hGH publicadas resíduos importantes para ligação de hGH a hGHR podem ser identificados. Ainda, as propriedades dinâmicas de hGH foram estudadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*) (NMR) (Kasimova, M.R. e outros, *J. Mol. Biol.* **318**, 679-695, (2002)). Em combinação, os dados de raio-X e NMR podem distinguir regiões de hGH que são bem estruturadas e bem definidas de regiões que são

menos estruturadas e dinâmicas. Regiões menos estruturadas e dinâmicas de hGH são esperadas ser particularmente suscetíveis à clivagem proteolítica e estabilização apropriada de tais regiões levaria à estabilidade proteolítica aperfeiçoada.

[0004] hGH foi submetido à mutagênese extensiva em tentativas de produzir análogos de hGH com propriedades químicas ou biológicas desejadas. Especificamente, mutantes de cisteína para vários propósitos foram descritos.

[0005] A US 2003/0162949 revela variantes de cisteína de membros da família de supergene de GH. É provido um método geral para criação de conjugados biologicamente ativos, específicos de sítio, dessas proteínas. O método envolve adição de resíduos cisteína a regiões não essenciais das proteínas ou substituição de aminoácidos não essenciais por resíduos cisteína nas proteínas usando mutagênese direcionada a sítio e então acoplando covalentemente um polímero reativo à cisteína ou outro tipo de porção reativa à cisteína às proteínas através do resíduo cisteína adicionado.

[0006] O WO 02/055532 descreve mutantes de hGH geneticamente engenheirados tendo pelo menos uma porção não polipeptídica covalentemente ligada, particularmente mutantes de hGH em que um resíduo cisteína introduzido foi usado para peguilação.

[0007] A U.S. 5.951.972 descreve proteínas e polipeptídeos de mamífero e humano naturais e recombinantes derivatizados fisiologicamente ativos em que pelo menos um resíduo cisteína de ocorrência natural ou incorporado dentro da proteína é derivatizado com vários substituintes.

[0008] A clivagem proteolítica de hGH foi estudada em detalhes. A alça longa composta de resíduos 128 a 154 tem sítios de clivagem putativos para várias proteases, tais como serina proteases tipo trombina, plasmina, collagenase, subtilisina e quimiotripsina. Desta

maneira, esta parte de hGH foi mostrada ser particularmente suscetível à clivagem proteolítica (Lewis, U.J., *Ann. Rev. Physiol.* **46**, 33-42, (1984)). Enzimas relatadas degradar hGH incluem serina proteinases tipo trombina, plasmina, subtilisina, quimiotripsina e calicreínas.

[0009] A degradação de hGH em tecido de rato foi investigada (Garcia-Barros e outros, *J. Endocrinol. Invest.* **23**, 748-754, (2000)).

[00010] Em glândula tireoide de rato proteases tipo quimiotripsina, favorecendo clivagem em resíduos de aminoácido volumosos e lipofílicos, foram verificadas inicialmente clivar a ligação de peptídeo entre Y143 e S144 resultando em uma molécula de duas cadeias, seguido por clivagem entre Y42 e S43, liberando o peptídeo N-terminal F1-Y42. A alça separada na molécula de duas cadeias é processada mais através de clivagem entre F146 e D147 por proteases tipo quimiotripsina e ainda pela ação de carboxipeptidases.

[00011] Vários métodos para produzir análogos de hGH estabilizados com relação à degradação proteolítica foram relatados.

[00012] Alam e outros, *J. Biotech.* **65**, 183-190 (1998)), projetaram mutantes de hGH resistentes à trombina e plasmina através de mutações de ponto específicas. A trombina cliva hGH especificamente entre R134 e T135, o mutante duplo R134D, T235P forneceu uma variante de hGH resistente à clivagem por trombina e o mutante triplo R134D, T135P, K140A resultou em resistência à plasmina. Ainda, o último mutante de hGH era resistente à proteólise por plasma humano durante um período de 7 dias.

[00013] A EP534568 descreve mutantes de hGH estabilizados com relação à degradação proteolítica através de mutação de R134 para alanina, leucina, treonina, fenilalanina, prolina ou histidina.

[00014] O WO2004022593/Nautilus descreve métodos de evolução direcionada de alto rendimento gerais para produzir citocinas

modificadas, incluindo variantes de GH, com estabilidade proteolítica aumentada.

[00015] O WO2006/048777/Nautilus descreve especificamente análogos de hGH modificados com estabilidade proteolítica aperfeiçoada. Os análogos contêm uma a cinco mutações nas posições 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 e 187-191. Introdução de resíduos cisteína pode levar potencialmente à formação de dímeros ligados a dissulfeto indesejados e no WO2006/048777 a substituição de resíduos de aminoácido por cisteína é especificamente excluída do escopo; no WO2006/048777 (p. 65) é declarado: "A substituição de aminoácidos por resíduos cisteína é explicitamente evitada uma vez que esta mudança poderia potencialmente levar à formação de ligações dissulfeto intermoleculares".

[00016] Há uma necessidade óbvia de desenvolver compostos de hGH que sejam resistentes à degradação proteolítica. Tais compostos estabilizados devem exibir estabilidade aumentada com relação à clivagem proteolítica enquanto retendo as propriedades biológicas desejadas de hGH. Tais moléculas de GH teriam estabilidade aumentada, eliminação mais lenta e/ou meia-vida *in vivo* prolongada.

[00017] É ainda bem conhecido modificar as propriedades e características de peptídeos através da conjugação de grupos ao peptídeo que mudem devidamente as propriedades do peptídeo. Tal conjugação geralmente requer algum grupo funcional no peptídeo para reagir com outro grupo funcional em um grupo de conjugação. Tipicamente, grupos amino, tal como o grupo amino N-terminal ou o grupo  $\epsilon$ -amino em lisinas, tem sido usados em combinação com um reagente de acilação adequado. Alternativamente, polietileno glicol (PEG) ou derivados do mesmo podem ser presos às proteínas. Para uma revisão vide *Exp. Opin. Ther. Patent.* **14**, 859-894 (2004). Foi

mostrado que a ligação de PEG a hormônio do crescimento pode ter um efeito positivo sobre a meia-vida no plasma de hormônio do crescimento, WO 03/044056.

[00018] O uso de carboxipeptidases para modificar o terminal C de peptídeos foi descrito anteriormente. O WO 92/05271 revela o uso de carboxipeptidases e compostos nucleofílicos para amidar o grupo carbóxi C-terminal e o WO 98/38285 revela variantes de carboxipeptidase Y particularmente adequadas para este propósito.

[00019] A EP 243 929 revela o uso de carboxipeptidases para incorporar peptídeos, grupos repórteres ou agentes citotóxicos ao terminal C de proteínas ou polipeptídeos.

[00020] O WO 2005/035553 descreve métodos para conjugação seletiva de peptídeos incorporando enzimaticamente um grupo funcional ao terminal C de um peptídeo.

[00021] Derivados de halogênio ativados e maleimidas representam alguns dos grupos funcionais mais comumente usados quando incorporando conjugados a grupos sulfidrilas em peptídeos (G. T. Hermanson em *Bioconjugate Techniques*, 2<sup>a</sup>. Ed. 2008, Elsevier).

[00022] Transglutaminase foi anteriormente usada para alterar as propriedades de peptídeos. Na indústria alimentícia e em particular na indústria de laticínio, muitas técnicas estão disponíveis para, por exemplo, ligar com cruzamento peptídeos usando transglutaminase. Outros documentos revelam o uso de transglutaminase para alterar as propriedades de peptídeos fisiologicamente ativos. A EP 950665, EP 785276 e Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 487-504 (2002) revelam a reação direta entre peptídeos compreendendo pelo menos uma Gln e PEG funcionalizado com amina ou ligantes similares na presença de transglutaminase e Wada, *Biotech. Lett.* **23**, 1367-1372 (2001) revela a conjugação direta de  $\beta$ -lactoglobulina com ácidos graxos por meio de transglutaminase. O pedido de patente internacional publicado como

WO 2005/070468 revela o uso de transglutaminase para incorporar uma alça à qual grupos de conjugação podem ser presos.

[00023] O hormônio do crescimento é um hormônio-chave envolvido na regulação não apenas de crescimento somático, mas também na regulação de metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos. O efeito principal do hormônio do crescimento é promover crescimento. O hormônio do crescimento humano é uma proteína de 191 resíduos de aminoácido com a sequência:

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP  
QTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF  
ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYS  
KFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF  
(SEQ ID NO: 1).

[00024] Administração de hormônio do crescimento humano e suas variantes intimamente relacionadas é usada para tratar uma variedade de doenças relacionadas à deficiência de hormônio do crescimento. Sendo um polipeptídeo, o hormônio do crescimento é administrado parenteralmente, isto é, por meio de uma agulha. O hormônio do crescimento é, ainda, caracterizado por uma meia-vida relativamente curta, então administrações frequentes são requeridas com a dor correspondente e inconveniência para o paciente. Então, há ainda uma necessidade de provisão de compostos de hormônio do crescimento com propriedades farmacológicas aperfeiçoadas, tal como, por exemplo, meia-vida prolongada.

[00025] A presente invenção provê novos conjugados de composto de hormônio do crescimento com propriedades farmacocinéticas e farmacológicas aperfeiçoadas bem como métodos para sua produção.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00026] A biodisponibilidade de um composto farmacêutico subcutaneamente administrado pode estar relacionada com a taxa de

absorção. A habilidade de um composto em passar as junções firmes dos capilares subcutâneos pode em parte estar relacionada às suas propriedades físicas e químicas bem como o tamanho molecular ou o volume hidrodinâmico do composto. Um conjugado de proteína tal como um hGH peguilado (PEG-hGH) com um PEG de 40 kDa tem um peso molecular aparente de 150-250 kDa. Uma molécula de hGH com albumina ligada covalente tem um peso molecular de 87 kDa, enquanto uma molécula de hGH com uma albumina ligada não covalente será dissociada da parte de albumina do momento e então tem um peso molecular de 22 kDa.

[00027] É compreendido que o tempo passado no estado dissociado depende, pelo menos em parte, da afinidade da porção de ligação à albumina. Então a taxa de absorção de uma molécula de hGH com uma albumina ligada não covalente pode ser mais rápida do que para um PEG-hGH. Uma taxa de absorção aumentada pode ser obtida quando usando porções de ligação à albumina tendo afinidade menor com albumina.

[00028] Adicionalmente, as propriedades físicas e químicas do ligante e/ou espaçador provendo a ligação da porção de ligação à albumina a hGH vão influenciar as funcionalidades dos compostos.

[00029] Os presente inventores constataram surpreendentemente que compostos de hormônio do crescimento (GH) com uma mutação Cys única e/ou uma ponte dissulfeto adicional podem ser seletivamente ligados a um resíduo de ligação à albumina – através de um espaçador hidrofílico que separa o GH e o resíduo de ligação à albumina, tipicamente com uma porção química tendo um  $m\text{LogP} < 0$  – ou um  $c\text{LogP} < 0,5$  para obter conjugados de GH com propriedades aperfeiçoadas, tal como potência *in vitro* alta, ou tal como um aumento na meia-vida *in vivo*, ou tal como como resistência aumentada à degradação proteolítica possivelmente em combinação com um perfil

de ação *in vivo* prolongado. Ao ligar um resíduo de ligação de albumina através de um espaçador hidrofílico à mutação de Cys única a atividade biológica pode ser retida e um ou mais dos aperfeiçoamentos mencionados acima podem ser obtidos. Tais aperfeiçoamentos são também obtidos quando um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao hormônio do crescimento tendo uma ponte dissulfeto adicional, tal como ao terminal N, posição 40 ou posição 141 de hGH. O composto de hormônio do crescimento pode também compreender ambas uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional, aspecto no qual o resíduo de ligação de albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado à mutação de Cys única.

[00030] Em um aspecto amplo a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento que compreende um composto de hormônio do crescimento (GH) tendo

- a) uma mutação de Cys única,
- b) uma ponte dissulfeto adicional, ou
- c) uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto

adicional,

em que um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao dito GH ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[00031] Em uma modalidade da presente invenção os compostos de hGH estáveis têm ligação(ões) dissulfeto adicional(ais). As ligações dissulfeto são formadas entre pares de cisteínas das quais uma ou ambas são introduzidas através de mutações de ponto na sequência de hGH do tipo selvagem.

[00032] Em outra modalidade da presente invenção os compostos de hGH estáveis têm cisteínas adicionais. As cisteínas são introduzidas através de mutações de ponto na sequência de hGH do

tipo selvagem.

[00033] Em uma modalidade adicional da presente invenção os compostos de hGH estáveis têm ligação(ões) dissulfeto adicional(ais) e uma ou mais cisteínas adicionais. A(s) ligação(ões) dissulfeto adicional(ais) entre pares de cisteínas adicionais e as cisteínas adicionais são introduzidas através de mutações de ponto na sequência de hGH do tipo selvagem.

[00034] Ainda, a presente invenção é baseada na observação que introdução de um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico em hormônio do crescimento humano (hGH) pode ser feita seletivamente, em que uma proporção grande da atividade foi retida. Preferivelmente, um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é introduzido na(s) posição(ões) correspondendo à(s) cisteína(s) introduzida(s) e/ou na posição glutamina 40 e/ou em posição glutamina 141 e/ou no terminal N em hGH tendo a sequência de SEQ ID NO:1. O uso de trans-glutaminase (TGase) e, em particular, TGase de *Streptoverticillium mobaraenae* ou *Streptomyces lydicus* permite uma introdução seletiva de um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico na posição 40 ou posição 141, e os 11 resíduos glutamina restantes são deixados intactos apesar do fato da glutamina ser um substrato para transglutaminase.

[00035] Desta maneira, em uma modalidade da presente invenção o composto de hormônio do crescimento (GH) é ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico. Tipicamente, o resíduo de ligação à albumina é ligado ao terminal N ou à posição 18, 30, 40, 42, 62, 69, 88, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 108, 135, 141 ou 154 de hGH através de um espaçador hidrofílico. Em modalidades adicionais dois resíduos de ligação à albumina são ligados à mutação de Cys única e qualquer uma das posições acima,

tal como o terminal N, posição 40 ou posição 41 de hGH através de um espaçador hidrofílico.

[00036] Os conjugados de composto de hormônio do crescimento da presente invenção têm absorção subcutânea mais rápida comparado com hGH PEGuilado e, então, proveem menos ou nenhuma lipoatrofia. Ainda, o resíduo de ligação à albumina e o espaçador hidrofílico são biodegradáveis em contraste com PEG.

[00037] É um objetivo adicional da presente invenção prover um método para aperfeiçoamento das propriedades de um GH através da conjugado da dita proteína de acordo com os métodos da presente invenção.

[00038] Em aspectos adicionais a invenção se refere a compostos de hormônio do crescimento isolados (GH) compreendendo uma mutação de cys única, uma ligação dissulfeto adicional ou compostos de hormônio do crescimento compreendendo uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional. Em um objetivo adicional da invenção tais compostos são solúveis.

### DEFINIÇÕES

[00039] No presente contexto, o termo "composto de hormônio do crescimento" conforme aqui usado significa hormônio do crescimento de origem de mamífero, tal como hormônio do crescimento humano, bovino ou porcino, e hormônio do crescimento recombinante, tal como hormônio do crescimento humano, bovino ou porcino recombinante, e variantes bem como mutantes de tais hormônios do crescimento. Conforme aqui usado, "GH" e "composto de hormônio do crescimento" são intercomutáveis. Quando GH é uma variante de hormônio do crescimento de origem de mamífero, tal como hGH e hGH recombinante, a dita variante é compreendida ser o composto obtido substituindo um ou mais resíduos de aminoácido na sequência de hormônio do crescimento, por exemplo, hGH, com outro aminoácido

natural ou não natural; e/ou adicionando um ou mais aminoácidos naturais ou não naturais à sequência de hormônio do crescimento, por exemplo, hGH; e/ou deletando um ou mais resíduo de aminoácido da sequência de hormônio do crescimento, por exemplo, hGH, em que qualquer uma dessas etapas pode ser opcionalmente seguida por derivatização adicional de um ou mais resíduos de aminoácido. Tipicamente, o GH tem pelo menos 80% de identidade com GH e, tipicamente, pelo menos 10% da atividade do hormônio do crescimento de hGH conforme determinado no ensaio (I) (Exemplo 46) aqui.

[00040] No presente contexto, o termo "resíduo de ligação à albumina" conforme aqui usado significa um resíduo que se liga não covalentemente à albumina de soro humana. O resíduo de ligação à albumina ligado ao composto de hormônio do crescimento (GH) tipicamente tem uma afinidade de ligação com relação à albumina de soro humano que está abaixo de cerca de 10  $\mu$ M ou até mesmo abaixo de cerca de 1  $\mu$ M. Uma faixa de resíduos de ligação à albumina é conhecida dentre porções lipofílicas lineares e ramificadas contendo 12-40 átomos de carbono, compostos com um esqueleto ciclopentanofenânico e/ou peptídeos tendo 10-45 resíduos de aminoácido, etc. As propriedades de ligação à albumina podem ser medidas através de ressonância de plasmon de superfície conforme descrito em *J. Biol. Chem.* **277**(38), 35035-35042 (2002).

[00041] O termo "espaçador hidrofílico" conforme aqui usado significa um espaçador que separa um composto de hormônio do crescimento e um resíduo de ligação à albumina com uma porção química que compreende pelo menos 5 átomos de não hidrogênio em que 30-50% desses são ou N ou O.

[00042] No presente contexto, o termo "transaminação" e termos relacionados pretendem indicar uma reação em que o nitrogênio

amida na cadeia lateral de glutamina é mudado com nitrogênio de outro composto, em particular nitrogênio de outro nucleófilo contendo nitrogênio.

[00043] Transglutaminase (E.C.2.3.2.13) é também conhecida como proteína-glutamina- $\gamma$ -glutamyltransferase e catalisa a reação geral



[00044] Q-C(O)-NH<sub>2</sub> (aceitador de amina) pode representar um resíduo glutamina contendo peptídeo ou proteína e Q'-NH<sub>2</sub> (doador de amina) representa um nucleófilo contendo amina. Alternativamente, Q-C(O)-NH<sub>2</sub> e Q'-NH<sub>2</sub> podem representar um aceitador de amina e um peptídeo ou proteína contendo lisina, respectivamente. Na presente invenção, no entanto, Q-C(O)-NH<sub>2</sub> representa um resíduo glutamina contendo hormônio do crescimento e Q'-NH<sub>2</sub> representa um nucleófilo contendo amina conforme indicado acima.

[00045] Exemplos de transglutaminases úteis incluem transglutaminases microbianas, tais como, por exemplo, aquelas de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* e *Streptomyces griseocarneum* (todos descritos na US 5.156.956, que é aqui incorporada a título de referência) e de *Streptomyces lavendulae* (revelado na US 5.252.469, que é aqui incorporada a título de referência) e *Streptomyces ladakanum* (JP 2003/199569, que é aqui incorporada a título de referência). Deve ser notado que membros do gênero anterior *Streptoverticillium* são agora incluídos no gênero *Streptomyces* (Kaempfer, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1831-1892, (1991)). Outras transglutaminases microbianas úteis foram isoladas de *Bacillus subtilis* (revelada na US 5.731.183, que é incorporada aqui a título de referência) e de vários *Myxomycetes*. Outros exemplos de transglutaminases microbianas úteis são aqueles revelados no WO

96/06931 (por exemplo, transglutaminase de *Bacillus ltydicus*) e WO 96/22366, ambos aqui incorporados a título de referência. Transglutaminases não microbianas úteis incluem transglutaminase de fígado de porquinho-da-índia e transglutaminase de várias fontes marinhas tal como o peixe chato *Pagrus major* (revelado na EP-0555649, que é aqui incorporada a título de referência) e a ostra Japonesa *Crassostreae gigas* (revelada na US 5.736.356, que é aqui incorporada a título de referência).

[00046] No presente contexto, o termo "não acessível" pretende indicar que alguma coisa está ausente ou *de facto* ausente no sentido que não pode ser obtida. Quando é declarado que grupos funcionais não são acessíveis em uma proteína a ser conjugada é pretendido indicar que o dito grupo funcional está ausente da proteína ou, se presente, de alguma maneira prevenido de participar em reações. A título de exemplo, o dito grupo funcional poderia ser enterrado bem fundo na estrutura da proteína de maneira que ele é protegido de participar na reação. É reconhecido que se ou não um grupo funcional é acessível depende das condições de reação. Pode ser imaginado que, por exemplo, na presença de agentes de desnaturação ou em temperaturas elevadas a proteína pode desdobrar para expor de outra maneira grupos funcionais não acessíveis. Deve ser compreendido que "não acessível" significa "não acessível na condição de reação escolhida para a reação de interesse particular".

[00047] O termo "alcano" ou "alquila" pretende indicar um hidrocarbono saturado, linear, ramificado e/ou cíclico. A menos que especificado com outro número de átomos de carbono, o termo pretende indicar hidrocarbonos com a partir de 1 a 30 (ambos incluídos) átomos de carbono, tal como 1 a 20 (ambos incluídos), tal como de a partir de 1 a 10 (ambos incluídos), por exemplo, de a partir de 1 a 5 (ambos incluídos). Os termos alquila e alquilenos se referem

ao radical e ao birradical correspondente, respectivamente.

[00048] O termo "C<sub>1-6</sub> alquila" se refere a um hidrocarbono saturado de cadeia reta ou ramificada tendo de a partir de um a seis átomos de carbono inclusive. Exemplos de tais grupos incluem, mas não estão limitados a, metila, 2-propila, 1-butila, 2-butila, 2-metil-2-propila, 2-metil-1-butila e n-hexila.

[00049] O termo "C<sub>3-10</sub> cicloalquila" se refere tipicamente à ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, cicloeptila, ciclooctila, ciclonoila e ciclodecanila.

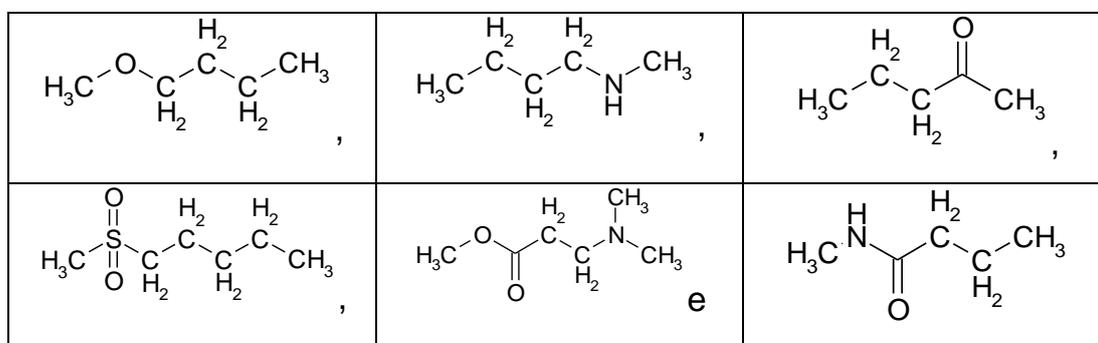
[00050] O termo "alceno" pretende indicar hidrocarbonos lineares, ramificados e/ou cíclicos compreendendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. A menos que especificado com outro número de átomos de carbono, o termo pretende indicar hidrocarbonos com de a partir de 2 a 30 átomos de carbono (ambos incluídos), tais como 2 a 20 (ambos incluídos), tal como de a partir de 2 a 10 (ambos incluídos), por exemplo, de a partir de 2 a 5 (ambos incluídos). Os termos alquenila e alquenileno se referem ao radical e ao bi-radical correspondente, respectivamente.

[00051] O termo "alcino" pretende indicar hidrocarbonos lineares, ramificados e/ou cíclicos compreendendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono e pode compreender opcionalmente uma ou mais ligações duplas carbono-carbono. A menos que especificado com outro número de átomos de carbono, o termo pretende indicar hidrocarbonos com a partir de 2 a 30 (ambos incluídos) átomos de carbono, tal como de a partir de 2 a 20 (ambos incluídos), tal como de a partir de 2 a 10 (ambos incluídos), por exemplo, de a partir de 2 a 5 (ambos incluídos). Os termos alquinila e alquinileno se referem ao radical e ao birradical correspondente, respectivamente.

[00052] O termo "composto aromático homocíclico" pretende indicar hidrocarbonos aromáticos, tais como benzeno e naftaleno.

[00053] O termo "composto heterocíclico" pretende indicar um composto cíclico compreendendo 5, 6 ou 7 átomos no anel dos quais 1, 2, 3 ou 4 são heteroátomos selecionados de N, O e/ou S. Exemplos incluem compostos aromáticos heterocíclicos tais como tiofeno, furano, pirano, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isooxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, bem como seus equivalentes parcialmente ou totalmente hidrogenados, tais como piperidina, pirazolidina, pirrolidina, pirrolila, imidazolidina, imidazolina, piperazina e morfolina.

[00054] Os termos "hetero alcano", "hetero alceno" e "hetero alcina" pretendem indicar alcanos, alcenos e alcinas conforme acima definido, em que um ou mais heteroátomos ou grupo foram inseridos na estrutura das ditas porções. Exemplos de grupos e átomos hetero incluem -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -C(O)- -C(S)- e -N(R\*)-, em que R\* representa hidrogênio ou C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila. Exemplos de heteroalcanos incluem.



[00055] O termo "radical" ou "birradical" pretende indicar um composto do qual um ou dois, respectivamente, átomos de hidrogênio foram removidos. Quando especificamente declarado, um radical pode também indicar a porção formada pela remoção formal de um grupo maior de átomos, por exemplo, hidroxila, de um composto.

[00056] O termo "halogênio" pretende indicar membros do sétimo grupo principal da tabela periódica, por exemplo, F, Cl, Br e I.

[00057] No presente contexto, o termo "arila" pretende indicar um radical de anel aromático carbocíclico ou um radical de sistema de

anel aromático fundido em que pelo menos um dos anéis é aromático. Grupos arila típicos incluem fenila, bifenila, naftila e similar.

[00058] O termo "heteroarila" ou "hetarila", conforme aqui usado, sozinho ou em combinação, se refere a um radical de anel aromático com, por exemplo, 5 a 7 átomos membros, ou a um radical de sistema de anel aromático fundido com, por exemplo, 7 a 18 átomos membros, em que pelo menos um anel é aromático, contendo um ou mais heteroátomos como átomos de anel selecionados de nitrogênio, oxigênio ou heteroátomos de enxofre, em que N-óxidos e monóxidos de enxofre e dióxidos de enxofre são substituições heteroaromáticas permissíveis. Exemplos incluem furanila, tienila, tioenila, pirrolila, imidazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolila, tiazolila, oxazolila, isoxazolila, oxadiazolila, tiadiazolila, isotiazolila, piridinila, piridazinila, pirazinila, pirimidinila, quinolinila, isoquinolinila, benzofuranila, benzotiofenila, indolila e indazolila e similar.

[00059] O termo "conjugado" como um substantivo pretende indicar uma proteína modificada, isto é, proteína com uma porção ligada a ela a fim de modificar as propriedades da dita proteína. Como um verbo, o termo pretende indicar o processo de ligação de uma porção a uma proteína para modificar as propriedades da dita proteína.

[00060] O termo "cys única" ou uma "cisteína livre" se refere a um resíduo cisteína que não está engajado em ligação dupla. Uma proteína pode então incluir um ou mais resíduos de cys única em adição a uma ou mais ponte(s) dissulfeto adicionais, contanto que a dita cys única não leve a ponte(s) dissulfeto internas.

[00061] Conforme aqui usado, o termo "pró-fármaco" indica amidas bioidrolisáveis e ésteres bioidrolisáveis e também compreende a) compostos em que a funcionalidade bioidrolisável em tal pró-fármaco é compreendida no composto de acordo com a presente invenção e b) compostos que podem ser oxidados ou reduzidos biologicamente em

um dado grupo funcional para dar substâncias de fármaco de acordo com a presente invenção. Exemplos desses grupos funcionais incluem 1,4-di-hidropiridina, N-alquilcarbonil-1,4-di-hidropiridina, 1,4-ciclohexadieno, *terc*-butila e similar.

[00062] Conforme aqui usado, o termo "éster bioidrolisável" é um éster de uma substância de fármaco (*in casu*, um composto de acordo com a invenção) que ou a) não interfere com a atividade biológica da substância de origem, mas confere a esta substância propriedades vantajosas *in vivo* tal como duração de ação, início de ação e similar ou b) é biologicamente inativo, mas é prontamente convertido *in vivo* pelo indivíduo no princípio biologicamente ativo. A vantagem é, por exemplo, solubilidade aumentada ou que o éster bioidrolisável é oralmente absorvido do intestino e é transformado em um composto de acordo com a presente invenção em plasma. Muitos exemplos de tais são conhecidos na técnica e incluem, a título de exemplo, ésteres de alquila inferior (por exemplo, C1-C4), ésteres de aciloxialquila inferior, ésteres de alcoxiaciloxialquila inferior, ésteres de alcoxiacilóxi, ésteres de alquil acilamino alquila e ésteres de colina.

[00063] Conforme aqui usado, o termo "amida bioidrolisável" é uma amida de uma substância de fármaco (*in casu*, um composto de acordo com a presente invenção) que ou a) não interfere com a atividade biológica da substância paralela, mas confere a esta substância propriedades vantajosas *in vivo* tais como duração de ação, início de ação ou similar ou b) é biologicamente inativa, mas é prontamente convertida *in vivo* pelo indivíduo no princípio biologicamente ativo. A vantagem é, por exemplo, solubilidade aumentada ou que a amida bioidrolisável é oralmente absorvida a partir do intestino e é transformada em um composto de acordo com a presente invenção em plasma. Muitos exemplos de tais são conhecidos na técnica e incluem a título de exemplo alquil amidas

inferior, amidas de  $\alpha$ -aminoácido, alcoxiacil amidas e alquilaminoalquilcarbonil amidas.

[00064] No presente contexto, o termo "sal farmacologicamente aceitável" pretende indicar sais que não são prejudiciais para o paciente. Tais sais incluem sais de adição ácidos farmacologicamente aceitáveis, sais de metal farmacologicamente aceitáveis, sais de amônio e amônio alquilado. Sais de adição ácidos incluem sais de ácidos inorgânicos bem como ácidos orgânicos. Exemplos representativos de ácidos inorgânicos adequados incluem ácidos clorídrico, bromídrico, iodídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico e similar. Exemplos representativos de ácidos orgânicos adequados incluem ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiônico, benzoico, cinâmico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malônico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanossulfônico, etanossulfônico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetileno salicílico, etanodissulfônico, glucônico, citracônico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutâmico, benzenossulfônico, p-toluenossulfônico e similar. Exemplos adicionais de sais de adição ácidos inorgânicos e orgânicos farmacologicamente aceitáveis incluem os sais farmacologicamente aceitáveis listados em *J. Pharm. Sci.* **66**, 2, (1977) que é aqui incorporado aqui a título de referência. Exemplos de sais de metal incluem sais de lítio, sódio, potássio, magnésio e similar. Exemplos de sais de amônio e amônio alquilado incluem sais de amônio, metilamônio, dimetilamônio, trimetilamônio, etilamônio, hidroxietilamônio, dietilamônio, butilamônio, tetrametilamônio e similar.

[00065] Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" de um composto conforme aqui usado significa uma quantidade suficiente para curar, aliviar ou parcialmente parar as manifestações clínicas de uma dada doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para realizar

isto é definida como "quantidade terapeuticamente eficaz". Quantidades eficazes para cada propósito vão depender da severidade da doença ou lesão bem como do peso e estado geral do indivíduo. Será compreendido que determinação de uma dosagem apropriada pode ser obtida usando experimentação de rotina, através da construção de uma matriz de valores e teste de pontos diferentes na matriz, que está tudo dentro das habilidades comuns de um médico ou veterinário treinado.

[00066] Os termos "tratamento" e "tratando" conforme aqui usado significam o tratamento e o cuidado de um paciente para o propósito de combater uma condição, tal como uma doença ou um distúrbio. O termo pretende incluir o espectro amplo de tratamentos para uma dada condição da qual o dito paciente está sofrendo, tal como administração do composto ativo para aliviar os sintomas ou complicações, retardar a progressão da doença, distúrbio ou condição, aliviar ou mitigar os sintomas e complicações e/ou curar ou eliminar a doença, distúrbio ou condição bem como prevenir a condição, em que prevenção deve ser compreendida como o tratamento e cuidado de um paciente para o propósito de combater a doença, condição ou distúrbio e inclui a administração dos compostos ativos para prevenir o início dos sintomas ou complicações. O paciente a ser tratado é preferivelmente um mamífero; em particular um ser humano, mas também pode incluir animais, tais como cachorros, gatos, vacas, ovelha e porcos.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[00067] Em um aspecto amplo a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento estável que compreende um composto de hormônio do crescimento (GH) tendo

- a) uma mutação de Cys única,
- b) uma ponte dissulfeto adicional, ou
- c) uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto

adicional,

em que um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao dito GH, ou

um sal farmacologicamente aceitável.

[00068] Quando uma mutação de Cys única está presente, um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao resíduo de enxofre de Cys. Quando uma ponte dissulfeto adicional está presente (mas nenhuma mutação Cys única) então um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado a uma posição no composto de hormônio do crescimento, tal como posição 40, posição 141 ou o terminal N de hGH, conforme aqui descrito. Quando dois ou mais resíduos de ligação à albumina são ligados ao composto de hormônio do crescimento através de um espaçador hidrofílico, então tais resíduos de ligação à albumina são ligados a uma mutação de Cys única se tal mutação estiver presente ou se apenas uma ponte dissulfeto adicional estiver presente então um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado a uma posição no composto de hormônio do crescimento conforme descrito aqui.

[00069] Em uma modalidade o composto de hormônio do crescimento tem uma mutação de Cys única.

[00070] Em outra modalidade o composto de hormônio do crescimento tem duas mutações de Cys única.

[00071] Em uma modalidade adicional o composto de hormônio do crescimento tem uma ponte dissulfeto adicional.

[00072] Em uma modalidade adicional o composto de hormônio do crescimento tem uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional.

[00073] Em uma modalidade adicional GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de

aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, GH tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 95%, de identidade com hGH, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98% ou tal como pelo menos 99%, de identidade com a SEQ ID NO:1. Em modalidades adicionais, as ditas identidades com hGH são acopladas a pelo menos 10%, tal como pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80%, da atividade de hormônio do crescimento de hGH conforme determinado no ensaio I aqui. Qualquer uma das modalidades de identidade de sequência pode ser combinada com qualquer uma das modalidades da atividade, tal como um GH tendo pelo menos 80% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 60% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 90% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 40% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 95% de identidade com GH e acoplado a pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; e assim por diante. Conforme aqui descrito, HG pode ser expresso como MethHG que indica que a sequência compreende uma metionina N-terminal adicional.

[00074] Em uma modalidade GH é uma variante de hormônio do crescimento em que uma mutação de Cys única é introduzida. Em modalidades adicionais GH representa um composto de hormônio do crescimento contendo uma a cinco mutações em adição a uma mutação de Cys única.

[00075] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado à mutação de Cys única. Em uma modalidade a mutação de Cys única está na posição N-terminal, H1, H2, L2 ou H3 de GH. Em modalidades

adicionais, a mutação de Cys única é posicionada no terminal N, a mutação sendo qualquer uma de T3C, P5C, S7C ou em H1 (correspondendo a AA 9-35), a mutação sendo tal como qualquer uma de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C ou em L1 (correspondendo a AA36-71), a mutação sendo qualquer uma de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C ou preferivelmente qualquer uma de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C ou em H2, L2 ou H3 (correspondendo a AA 72-98, AA 99-106 e AA 107-127), a mutação sendo qualquer uma de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) ou em L3 ou H4 (correspondendo a AA128-154 e AA155-184). Em L3 e H4 (128-154 e AA155-184) a mutação sendo qualquer uma de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C ou no terminal C a mutação sendo qualquer uma de E186C, G187C G190C.

[00076] Se a mutação de Cys única estiver presente em uma variante de hGh a mutação está localizada em resíduos de aminoácido correspondentes.

[00077] Em modalidade particular do GH a mutação de Cys única foi introduzida em uma posição equivalente em um GH parental que é equivalente a uma posição de hGH (SEQ ID NO:1) selecionada do grupo consistindo em: 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 e G190, tal como o grupo consistindo em: T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 e G126 o conjugado de GH compreendendo ainda uma

porção de ligação à albumina na cadeia lateral do dito resíduo cisteína única.

[00078] Em modalidades adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de AA 93-106 em hGH ou resíduos correspondentes em variantes de hGH. Em modalidades específicas adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 ou AA 99-103 ou resíduos correspondentes.

[00079] Quando uma mutação de Cys única está presente no conjugado de composto de hormônio do crescimento da presente invenção, uma mutação de Cys única típica é E30C. Uma mutação de Cys única típica adicional é Y42C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S55C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S57C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S62C. Uma mutação de Cys única típica adicional é Q69C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S95C. Uma mutação de Cys única típica é A98C. Uma mutação de Cys única típica adicional é N99C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S100C. Uma mutação de Cys única típica adicional é L101C. Uma mutação de Cys única típica adicional é V102C. Uma mutação de Cys única típica adicional é S108C.

[00080] De acordo com a estrutura de cristal do complexo rhGH/receptor (PDB: 3HHR) o feixe consiste em quatro hélices principais: primeira hélice (A) dos resíduos 9 a 34, segunda hélice (B) dos resíduos 72 a 92 e dos resíduos 94 a 100, terceira hélice (C) dos resíduos 106 a 128 e quarta hélice (D) dos resíduos 155 a 184 (M.R. Kasimova e outros, *J. Mol. Biol.* **318**, 679-695 (2002)). As quatro hélices principais são referidas como o número da proteína. Resíduos que não são parte das regiões de hélice são definidos como resíduos de alça e podem ser parte de regiões flexíveis, alças, dobras  $\beta$ , grampos-de-cabelo e espirais. Uma localização ligeiramente diferente de hélice é obtida quando hGH está em complexo com sua proteína de

ligação (PDB: 1HWG), que é a definição de hélice referida acima.

[00081] Além disso, a invenção se refere a um conjugado de HG compreendendo pelo menos um resíduo cisteína introduzido, resíduo cisteína que foi introduzido em uma posição equivalente a uma posição em uma região de hélice ou alça de hGH. Em particular os resíduos de aminoácido podem ser introduzidos em uma posição exposta à superfície em uma região de hélice ou alça que tem mais de 25% de sua cadeia lateral expostos na superfície, preferivelmente mais de 50% de sua cadeia lateral expostos na superfície, por exemplo, em uma estrutura modelo de hGH sozinho ou em uma estrutura modelo de hGH complexado com suas duas moléculas receptoras. Em uma modalidade preferida, a posição na hélice ou na alça é equivalente a uma posição fora de um sítio de ligação de receptor de hGH. Resíduos expostos na superfície podem ser identificados usando algoritmos de química computacional. Por exemplo, acessibilidades de superfície relativas podem ser calculadas com o programa de computador Quanta 2005 da Accelrys Inc. usando as coordenadas atômicas das estruturas publicamente disponíveis (estruturas 1HGU e 1HWG de códigos de acesso PDB) e ajustes de parâmetro *default*. Uma descrição do princípio de base por detrás do algoritmo pode ser encontrada em B. Lee e F.M. Richards, "The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility", *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400, (1971).

[00082] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao GH tendo uma ponte dissulfeto adicional. Tipicamente, o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao terminal N, posição 40 ou posição 41 de hGH.

[00083] Em uma modalidade adicional o GH compreende ligações dissulfeto adicionais entre um segmento de alça e um segmento de

hélice ou dentro do segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[00084] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

[00085] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça com um segmento de hélice.

[00086] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça com hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98).

[00087] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional ligando a hélice 2 (correspondendo a AA 72-98) com a alça 3 (correspondendo a AA 128-154).

[00088] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácidos nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C na SEQ ID NO: 1.

[00089] Em uma modalidade adicional a ponte dissulfeto adicional de GH está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas

posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1).

[00090] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional está entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou R94C/D107C na SEQ ID NO: 1.

[00091] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional está entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C e/ou R94C/D107C na SEQ ID NO: 1.

[00092] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional está entre um dos pares de aminoácidos em posições correspondendo 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 e/ou S85C/S144C na SEQ ID NO: 1.

[00093] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional está entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C e/ou S85C/S144C na SEQ ID NO: 1. Tipicamente, a ponte dissulfeto adicional é

Q84C/Y143C.

[00094] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao GH tendo uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional. Tipicamente, o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado à mutação de Cys única. Em uma modalidade particular o GH tem uma ponte dissulfeto adicional Q84C/Y143C e uma mutação de Cys única L101C em que o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado.

[00095] Em modalidades adicionais o GH tem uma ponte dissulfeto adicional e uma mutação de Cys única selecionadas de qualquer uma 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 e G190C, tal como qualquer uma de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO:1) ou resíduos correspondentes em uma variante de hGH.

[00096] Em uma modalidade particular o GH tem uma ligação dissulfeto adicional e uma mutação de Cys única e a dita mutação de Cys única foi introduzida em uma posição equivalente para um GH parental que é equivalente a uma posição de hGH (SEQ ID NO:1) selecionada do grupo consistindo em: 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 e G190, preferivelmente o grupo; T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 e G126. O conjugado de GH compreende ainda uma porção de ligação à albumina na cadeia lateral do dito resíduo cisteína único.

[00097] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de Cys única e ligações dissulfeto adicionais entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro do segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[00098] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

[00099] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154, com um segmento de hélice, tal como hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98).

[000100] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e ligação dissulfeto adicional ligando a hélice 2 (correspondendo a AA 72-98) com a alça 3 (correspondendo a AA 128-154).

[000101] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C na SEQ ID NO: 1.

[000102] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ponte dissulfeto adicional entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1).

[000103] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ponte dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

[000104] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional é entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

[000105] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ponte dissulfeto adicional entre um dos

pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

[000106] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

[000107] A solubilidade de um espaçador hidrofílico (B) pode ser descrita por seu valor logP. LogP, também conhecido como o coeficiente de divisão, é o logaritmo da razão de concentrações de um composto nas duas fases de uma mistura de dois solventes não miscíveis em equilíbrio. Tipicamente um dos solventes é água, enquanto o segundo é selecionado de octan-1-ol, clorofórmio, ciclo-hexano e propileno glicol dipelargonato (PGDP). Valores logP medidos nesses solventes diferentes mostram diferenças principalmente devido a efeitos de ligação de hidrogênio. Octanol pode doar e aceitar ligações hidrogênio, enquanto ciclo-hexano é inerte. Clorofórmio pode doar ligações hidrogênio, enquanto PGDP pode apenas aceita-las. Valores LogP podem ser medidos através de métodos padrão conhecidos na técnica.

[000108] Em uma modalidade da invenção, o espaçador hidrofílico tem um LogP abaixo de 0, tal como abaixo de 0,5, em qualquer um de octan-1-ol, clorofórmio, ciclo-hexano e dipelargonato de propileno glicol (PGDP).

[000109] Em uma modalidade adicional, o espaçador hidrofílico tem um logP abaixo de -1 em qualquer um de octan-1-ol, clorofórmio, ciclo-hexano e dipelargonato de propileno glicol (PGDP).

[000110] Alternativamente, o valor LogP pode ser calculado como

mLogP e/ou cLogP para a parte de ligante de albumina ou parte de espaçador hidrofílico usando algoritmos publicados (T. Fujita; J. Iwasa e C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant,  $P_i$ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski e outros. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25, (1997) "Experimental e Computational Approaches to Estimate Solubility e Permeability in Drug Discovery e Development Settings" e 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").

[000111] Em uma modalidade da presente invenção, o espaçador hidrofílico (B) tem um mLogP < 0.

[000112] Em uma modalidade adicional o composto de hormônio do crescimento (GH) é ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico (B).

[000113] Em uma modalidade adicional, o composto de hormônio do crescimento (GH) é ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico (B) acoplado a uma cisteína livre no composto de hormônio do crescimento (GH).

[000114] Em outra modalidade o composto de hormônio do crescimento (GH) é ligado a dois resíduos de ligação à albumina através de um ou dois espaçadores hidrofílicos. Desta maneira, em um exemplo um resíduo de ligação à albumina é ligado através de um espaçador hidrofílico (B) à mutação de Cys única e o outro resíduo de ligação à albumina é ligado através de um espaçador hidrofílico (B') à glutamina na posição 40 ou posição 141; ou alternativamente dois resíduos de ligação à albumina são ligados através de um espaçador hidrofílico (B) à mutação de Cys única ou à glutamina na posição 40, posição 141 ou ao terminal N. Em ainda outra modalidade, o composto de hormônio do crescimento (GH) é ligado a três resíduos de ligação à

albumina através de um ou mais espaçadores hidrofílicos.

[000115] Em uma modalidade o espaçador hidrofílico compreende pelo menos um motivo OEG, o radical ácido 8-amino-3,6-dioxaoctânico, isto é,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ . Em uma modalidade especificada adicional o espaçador hidrofílico compreende pelo menos dois motivos OEG. A orientação de tais motivos OEG está em uma modalidade de maneira que o  $-\text{C}(\text{O})-$  esteja o mais próximo do composto de hormônio do crescimento, mas não conectando o composto de hormônio do crescimento e o ligante de albumina e o  $-\text{NH}-$  esteja o mais próximo do resíduo de ligação à albumina. Em modalidades adicionais compreendendo dois motivos de OEG os dois motivos têm orientação idêntica ou orientação diferente. Em uma modalidade, dois motivos de OEG deste tipo estão localizados adjacentes uns aos outros enquanto em modalidades alternativas tais motivos de OEG são separados por um ou mais átomos covalentemente ligados.

[000116] Em uma modalidade o espaçador hidrofílico compreende pelo menos pelo menos um resíduo de ácido glutâmico. O ácido glutâmico de aminoácido compreende dois grupos de ácido carboxílico. Seu grupo gama-carbóxi pode ser usado para formação de uma ligação amida com um grupo épsilon-amino de lisina, ou com um grupo amino de uma molécula de OEG, se presente, ou com o grupo amino de outro resíduo Glu, se presente. O grupo alfa-carbóxi pode ser alternativamente usado para formação de uma ligação amida similar com o grupo épsilon-amino de lisina ou com um grupo amino de uma molécula de OEG, se presente, ou com o grupo amino de outro resíduo Glu, se presente. O grupo amino de Glu pode por sua vez formar uma ligação amida com o grupo carbóxi do resíduo de ligação de albumina ou com o grupo carbóxi de um motivo de OEG, se presente, ou com o grupo gama-carbóxi ou grupo alfa-carbóxi de outro

Glu, se presente. A ligação do grupo amino de um Glu a um grupo gama-carbóxi de um segundo Glu pode ser referida como um motivo "gama-Glu".

[000117] Em uma modalidade o espaçador hidrofílico compreende pelo menos um motivo OEG-Glu (-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)NH-CH(C(O)OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-) ou pelo menos um motivo Glu-OEG combinado (-NH-CH(C(O)OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)-) ou suas combinações, em que tais motivos Glu-OEG e OEG-Glu podem ser separados por um ou mais átomos covalentemente ligados ou diretamente ligados uns aos outros por uma ligação amida do Glu's formando um gama-Glu.

[000118] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento em que o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única,

B representa um espaçador hidrofílico ligado ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

W é um grupo químico ligando A e B, e

A representa um resíduo de ligação à albumina, e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000119] Em uma modalidade adicional GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, GH tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98% ou tal como

pelo menos 99%, de identidade com hGH (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, as ditas identidades para hGH são acopladas a pelo menos 10%, tal como pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80%, da atividade de hormônio do crescimento de hGH conforme determinado no ensaio I aqui. Qualquer uma das modalidades de identidade de sequência pode ser combinada com qualquer uma das modalidades de atividade, tal como um GH tendo pelo menos 80% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 60% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 90% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 40% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 95% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH, e assim por diante.

[000120] Em modalidades adicionais o GH do conjugado tem uma mutação de Cys única selecionada de qualquer uma de uma mutação de Cys única nas regiões de terminal N, H1, H2, L2 ou H3 de GH. Em tais modalidades adicionais, a mutação de Cys única é posicionada no terminal N, a mutação sendo qualquer uma de T3C, P5C, S7C ou em H1 (correspondendo a AA 9-35), a mutação sendo qualquer uma de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C ou em L1 (correspondendo a AA36-71), a mutação sendo qualquer uma de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C ou preferivelmente qualquer uma de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C ou em H2, L2 ou H3 (correspondendo a AA 72-98, AA 99-16 e AA 107-127), a mutação sendo qualquer uma de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) ou em L3 ou H4 (correspondendo a AA 128-154 e AA 155-184). Em L3 e H4 (128-154 e AA155-184) a mutação sendo qualquer uma de E129C, D130C,

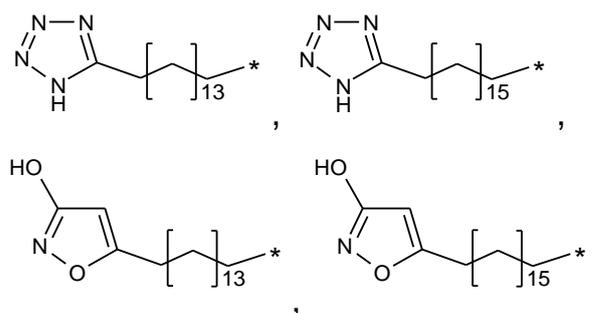
G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C ou no terminal C a mutação sendo qualquer uma de E186C G187C G190.

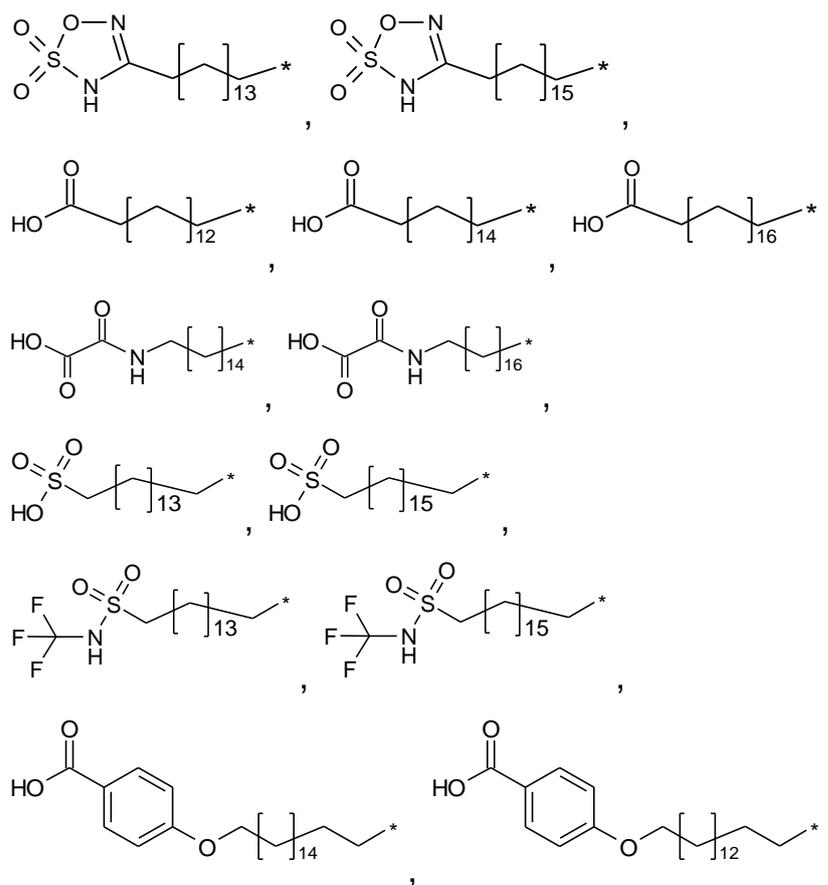
[000121] Se a mutação de Cys única estiver presente em uma variante de hGH, a mutação está localizada em resíduos de aminoácido correspondentes.

[000122] Modalidades adicionais incluem conjugados de GH, em que a mutação de cys única em GH é selecionada de qualquer uma 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 e G190C, tal como qualquer uma de: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1).

[000123] Em modalidades adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de AA 93-106 em hGH ou resíduos correspondentes em variantes de hGH. Em modalidades especificadas adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 ou AA 99-103 ou resíduos correspondentes.

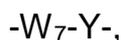
[000124] Em uma modalidade adicional A é selecionado de





em que \* significa a ligação a B através de W.

[000125] Em uma modalidade adicional W tem a fórmula



em que

Y é  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquila- $W_8$ - ou uma ligação de valência,

$17$  é 0-6,

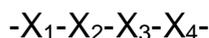
$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s3$  é 0 ou 1,

$W_8$  é selecionado 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)- ou uma ligação de valência; em que  $s_4$  é 0 ou 1.

[000126] Em modalidades adicionais B compreende ou consiste em um ou mais motivos OEG e/ou gama-Glu conforme descrito acima.

[000127] Em uma modalidade adicional B tem a fórmula



em que

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

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

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

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ ,

$l_1, l_2, l_3, l_4, l_5$  e  $l_6$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m_1, m_3, m_4, m_6$  e  $m_7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m_2$  e  $m_5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n_1, n_2, n_3$  e  $n_4$  são independentemente selecionados de 0-16,

F é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência, em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

$R^1, R^2, R^3, R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

$D_1, D_2, E_1$  e  $E_2$  são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

$W_1$  a  $W_5$  são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que  $s_2$  é 0 ou 1,

$W_6$  é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que  $s_1$  é 0 ou 1 e o grupo C<sub>1-6</sub>-alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000128] Em uma modalidade adicional, I1, I2, I3, I4, I5 e I6 são independentemente 0-6.

[000129] Em uma modalidade adicional, m1, m3, m4, m6 e m7 são independentemente 0-6.

[000130] Em uma modalidade adicional m2 e m5 são independentemente 0-10.

[000131] Em uma modalidade adicional n1, n2, n3 e n4 são independentemente 0-10.

[000132] Em uma modalidade adicional D1 e D2 são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

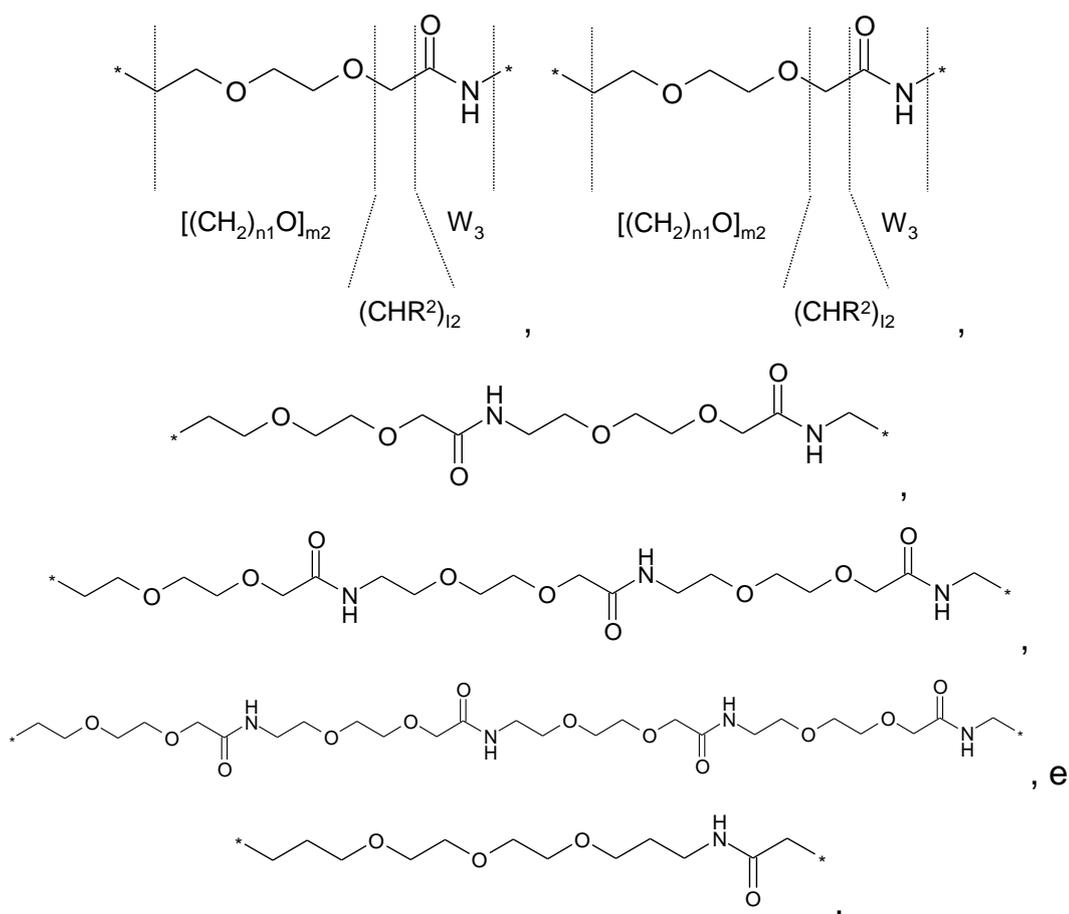
[000133] Em uma modalidade adicional E1 e E2 são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

[000134] Em uma modalidade adicional,  $W_1$  a  $W_8$  são independentemente selecionados do grupo consistindo em -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-</sub>

$\epsilon$ -alquila,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  ou  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ; em que (\*) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a  $X_4$ .

[000135] Em uma modalidade adicional,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  ou  $C_{1-6}$ -alquila; em que o grupo  $C_{1-6}$ -alquila é opcionalmente substituído com  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$  ou  $-S(O)_2OH$ .

[000136] Em uma modalidade adicional,  $-{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}}_{n2}$ - e  $-{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}}_{n4}$ -, em que E1 e E2 são  $-O-$ , são selecionados de

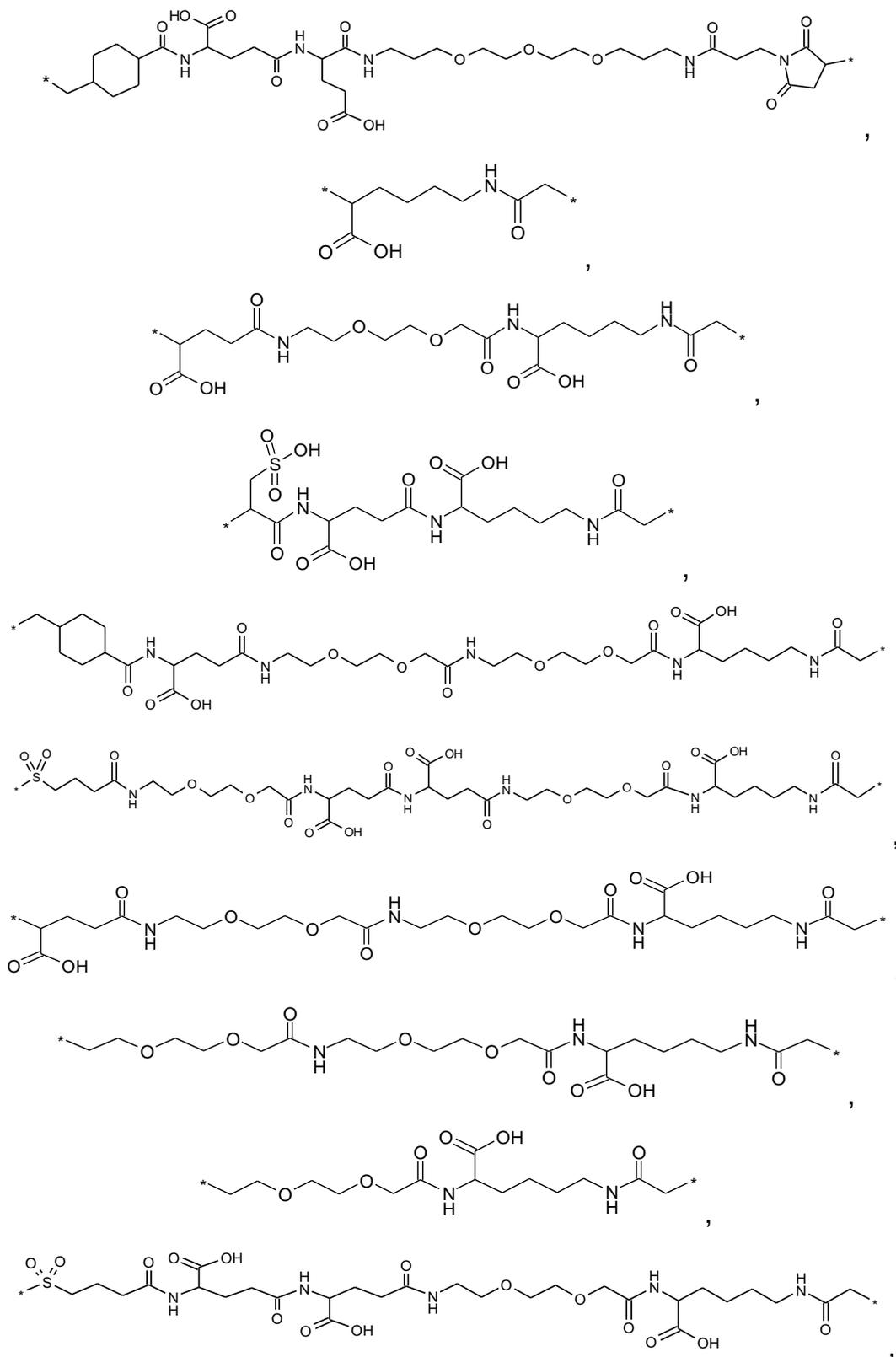


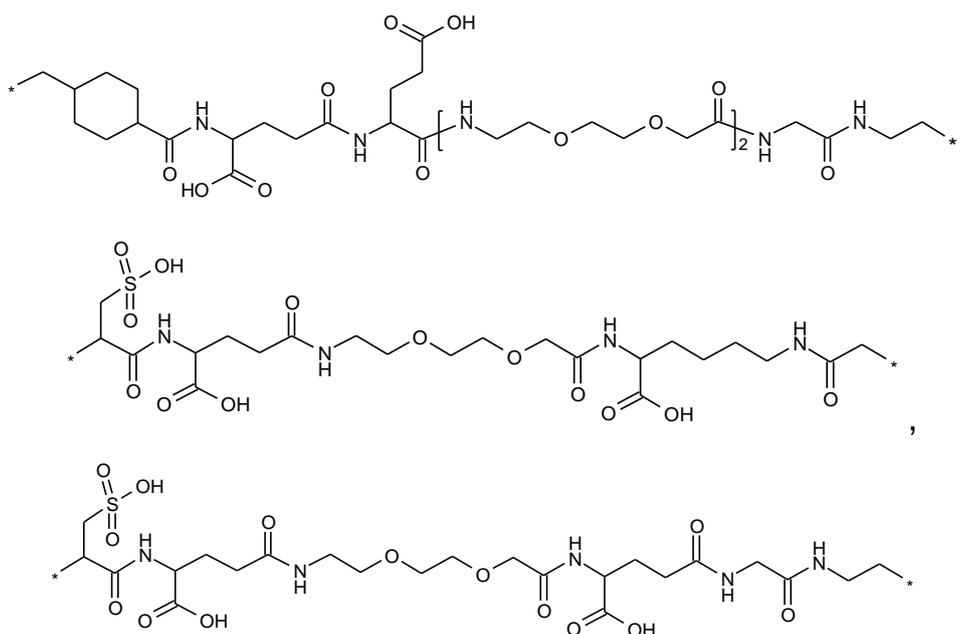
em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

[000137] Em uma modalidade adicional,  $X_4$  é uma ligação de valência e  $W_6$  é selecionado de qualquer um de pirrolidino-2,5-diona, -

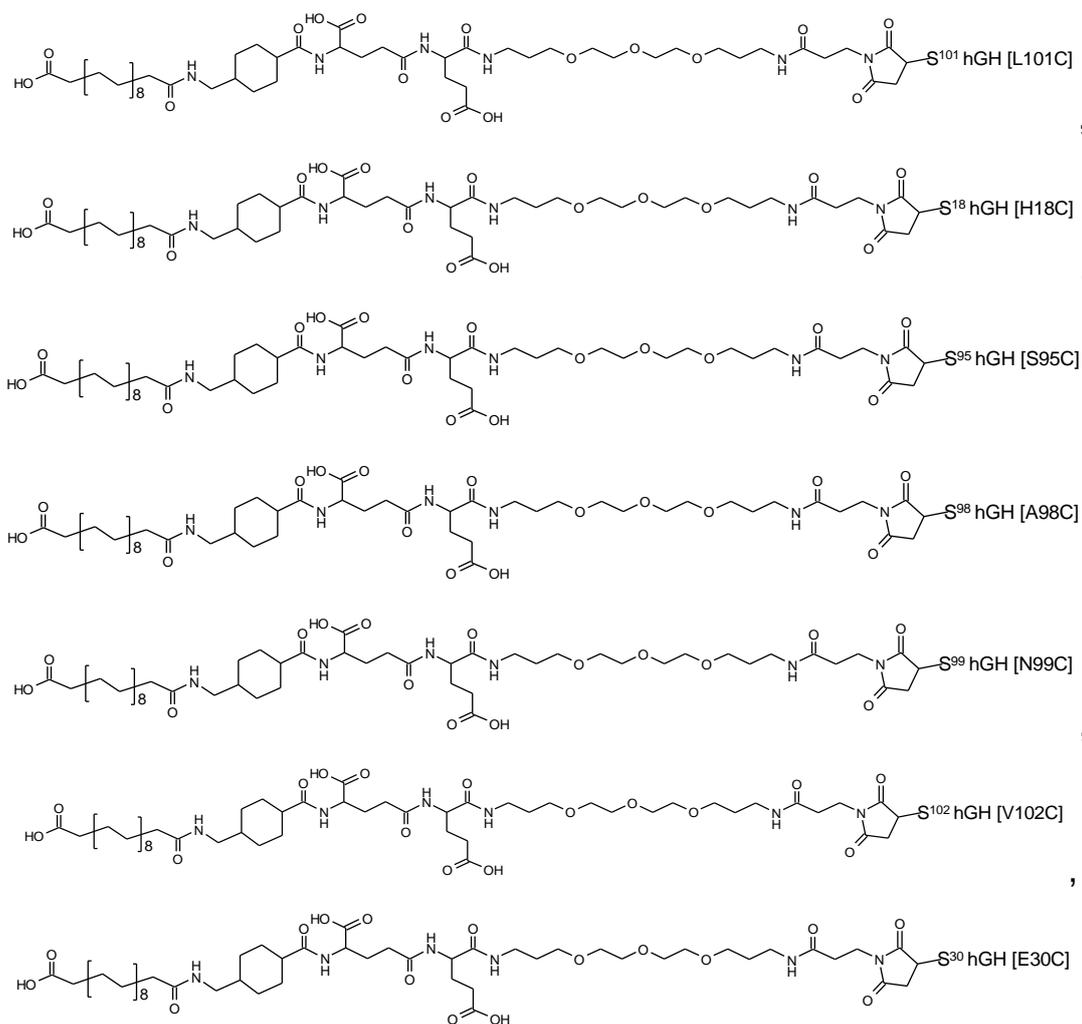
$\text{NHC(O)CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$  ou  $-\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$  em que (\*) indica o ponto de ligação a partir do átomo de carbono de CH a GH.

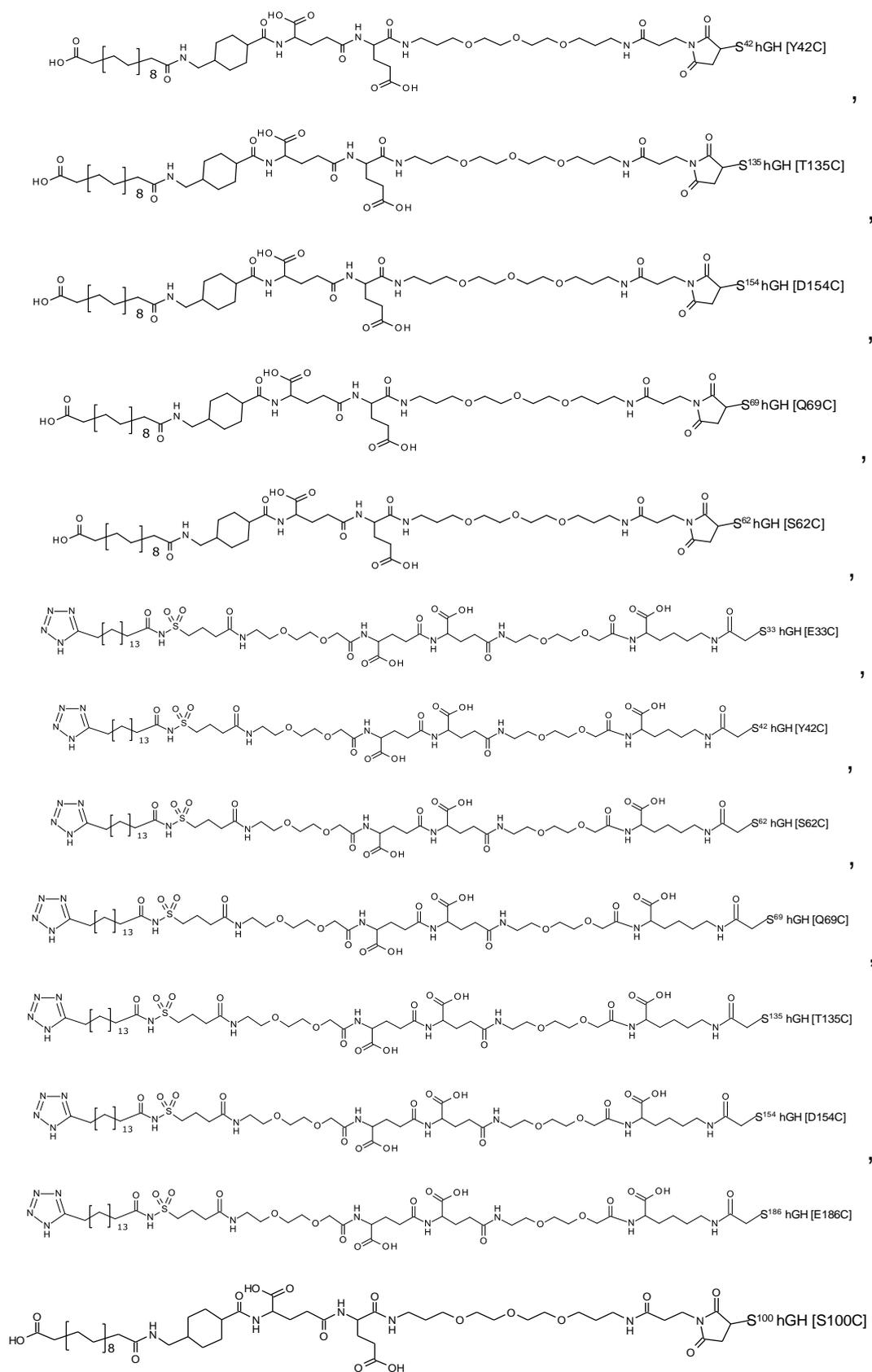
[000138] Em uma modalidade adicional B é selecionado de

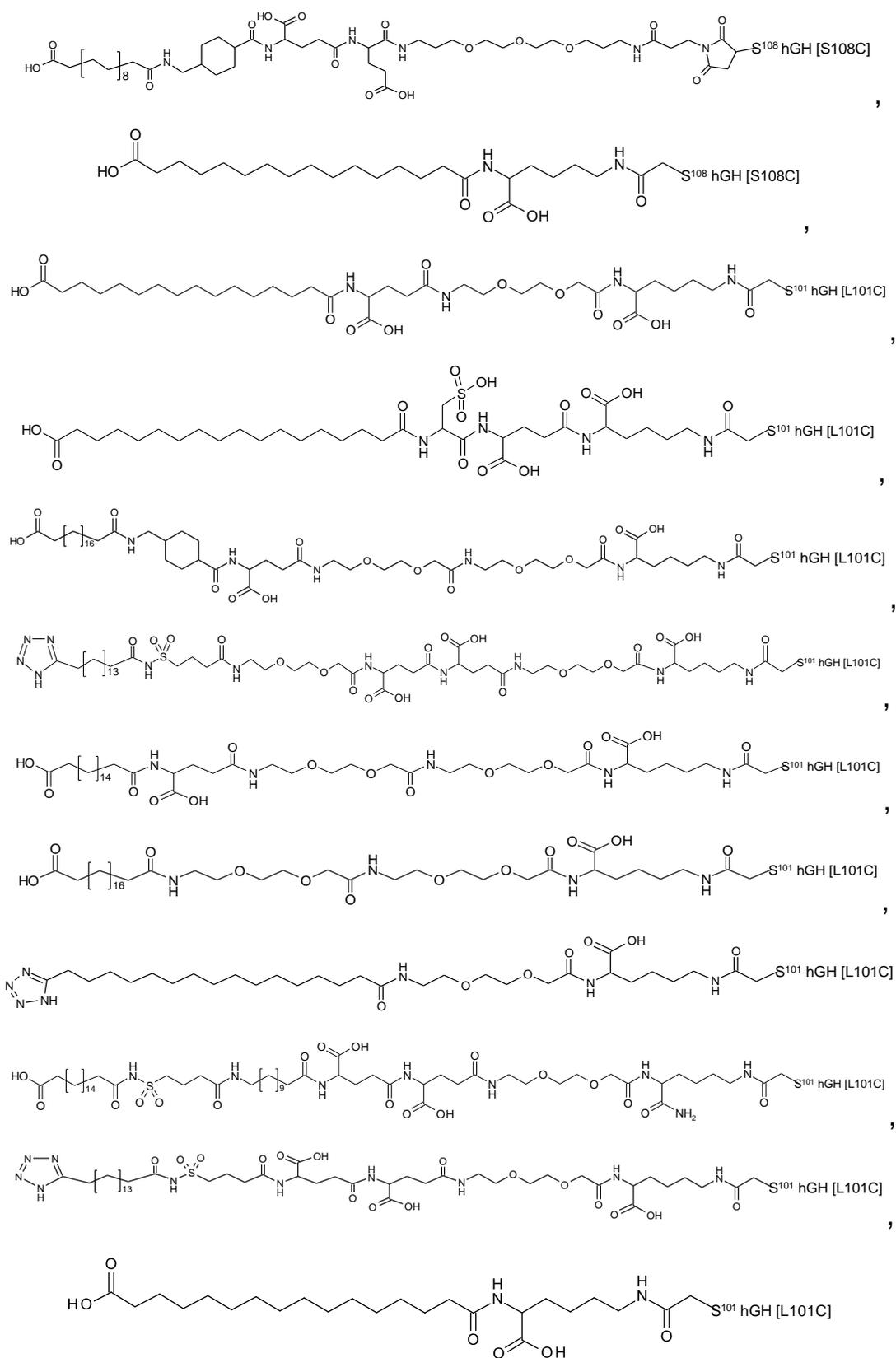




[000139] Em uma modalidade adicional o conjugado de GH é selecionado de







[000140] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento tendo a fórmula (I):

A-W-B-GH (I)

em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma ponte dissulfeto adicional,

B representa um espaçador hidrofílico,

W é um grupo químico ligando A e B, e

A representa um resíduo de ligação à albumina; e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000141] Em uma modalidade adicional GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, GH tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98% ou tal como pelo menos 99%, de identidade com hGH (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, as ditas identidades para hGH são acopladas a pelo menos 10%, tal como pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80%, da atividade de hormônio do crescimento de hGH conforme determinado no ensaio I aqui. Qualquer uma das modalidades de identidade de sequência pode ser combinada com qualquer uma das modalidades de atividade, tal como um GH tendo pelo menos 80% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 60% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 90% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 40% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 95% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH, e assim por diante.

[000142] Em uma modalidade adicional, GH do conjugado

compreende ligações dissulfeto adicionais entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro do segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[000143] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154.

[000144] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154 (H3), com um segmento de hélice, tal como hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98).

[000145] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional ligando a hélice 2 (correspondendo a AA 72-98) com alça 3 (correspondendo a AA 128-154).

[000146] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C e/ou V185C/S188C em SEQ ID NO: 1.

[000147] Em uma modalidade adicional a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1).

[000148] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

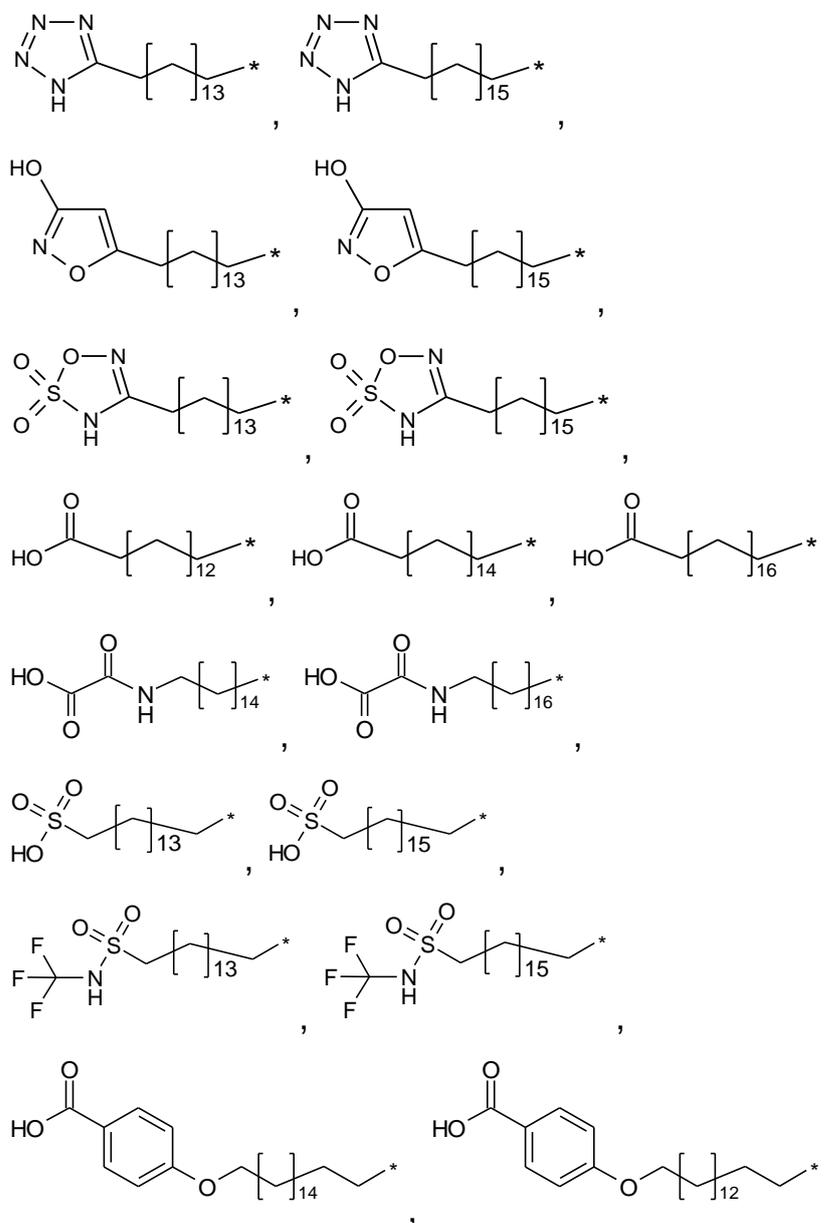
[000149] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional é entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

[000150] Em uma modalidade adicional i GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

[000151] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a S57C/Y143C,

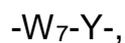
Q84C/Y143C, S85C/Y143C e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

[000152] Em uma modalidade adicional A é selecionado de



em que \* significa a ligação a B através de W.

[000153] Em uma modalidade adicional W tem a fórmula



em que

Y é  $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{C}_{3-10}\text{-cicloalquila}-\text{W}_8-$  ou uma ligação de valência,

17 é 0-6,

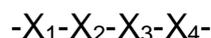
W<sub>7</sub> é selecionado de  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ , -

CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-,  
 -, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>-, -  
 C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>3</sub> é 0 ou  
 1,

W<sub>8</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -  
 CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-  
 -, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s4</sub>-, -  
 C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>4</sub> é 0 ou  
 1.

[000154] Em modalidades adicionais B compreende ou consiste em um ou mais motivos OEG e/ou gama-Glu conforme descrito acima.

[000155] Em uma modalidade adicional B tem a fórmula



em que

X<sub>1</sub> é -W<sub>1</sub>-[(CHR<sup>1</sup>)<sub>l1</sub>-W<sub>2</sub>]<sub>m1</sub>-{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>E1]<sub>m2</sub>-[(CHR<sup>2</sup>)<sub>l2</sub>-W<sub>3</sub>]<sub>m3</sub>]<sub>n2</sub>-,

X<sub>2</sub> é -[(CHR<sup>3</sup>)<sub>l3</sub>-W<sub>4</sub>]<sub>m4</sub>-{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>E2]<sub>m5</sub>-[(CHR<sup>4</sup>)<sub>l4</sub>-W<sub>5</sub>]<sub>m6</sub>]<sub>n4</sub>-,

X<sub>3</sub> é -[(CHR<sup>5</sup>)<sub>l5</sub>-W<sub>6</sub>]<sub>m7</sub>-,

X<sub>4</sub> é F-D1-(CH<sub>2</sub>)<sub>l6</sub>-D2-,

l<sub>1</sub>, l<sub>2</sub>, l<sub>3</sub>, l<sub>4</sub>, l<sub>5</sub> e l<sub>6</sub> são independentemente selecionados de 0-16,

m<sub>1</sub>, m<sub>3</sub>, m<sub>4</sub>, m<sub>6</sub> e m<sub>7</sub> são independentemente selecionados de 0-10,

m<sub>2</sub> e m<sub>5</sub> são independentemente selecionados de 0-25,

n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> e n<sub>4</sub> são independentemente selecionados de 0-16,

F é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência, em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados

de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

D1, D2, E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>2</sub> é 0 ou 1,

W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que s<sub>1</sub> é 0 ou 1 e o grupo C<sub>1-6</sub>-alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000156] Em uma modalidade adicional, I1, I2, I3, I4, I5 e I6 são independentemente 0-6.

[000157] Em uma modalidade adicional, m1, m3, m4, m6 e m7 são independentemente 0-6.

[000158] Em uma modalidade adicional m2 e m5 são independentemente 0-10.

[000159] Em uma modalidade adicional n1, n2, n3 e n4 são independentemente 0-10.

[000160] Em uma modalidade adicional D1 e D2 são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de

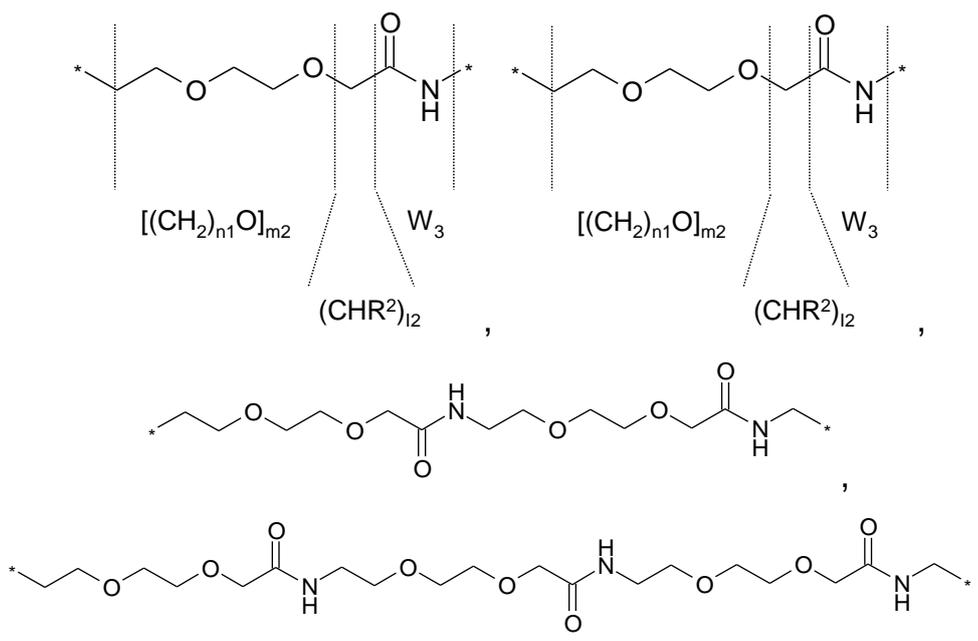
valência.

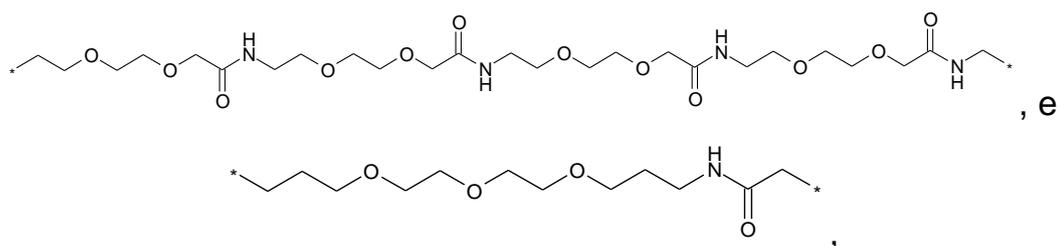
[000161] Em uma modalidade adicional E1 e E2 são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

[000162] Em uma modalidade adicional, W<sub>1</sub> a W<sub>8</sub> são independentemente selecionados do grupo consistindo em -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que (\*) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000163] Em uma modalidade adicional, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo C<sub>1-6</sub>-alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

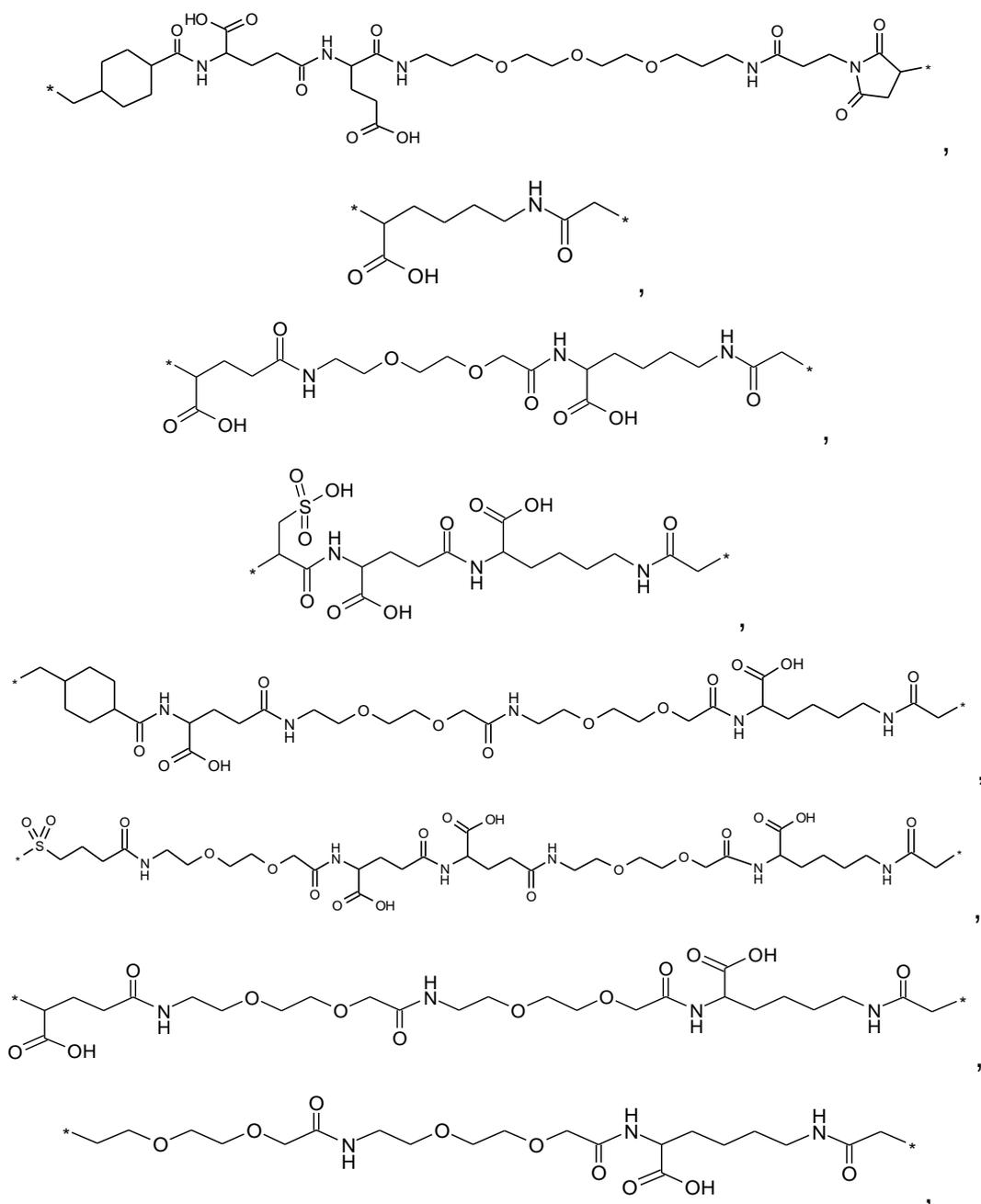
[000164] Em uma modalidade adicional, -{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>E1]<sub>m2</sub>-[(CHR<sup>2</sup>)<sub>l2</sub>-W<sub>3</sub>]<sub>m3</sub>]<sub>n2</sub>- e -{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>E2]<sub>m5</sub>-[(CHR<sup>4</sup>)<sub>l4</sub>-W<sub>5</sub>]<sub>m6</sub>]<sub>n4</sub>-, em que E1 e E2 são -O-, são selecionados de

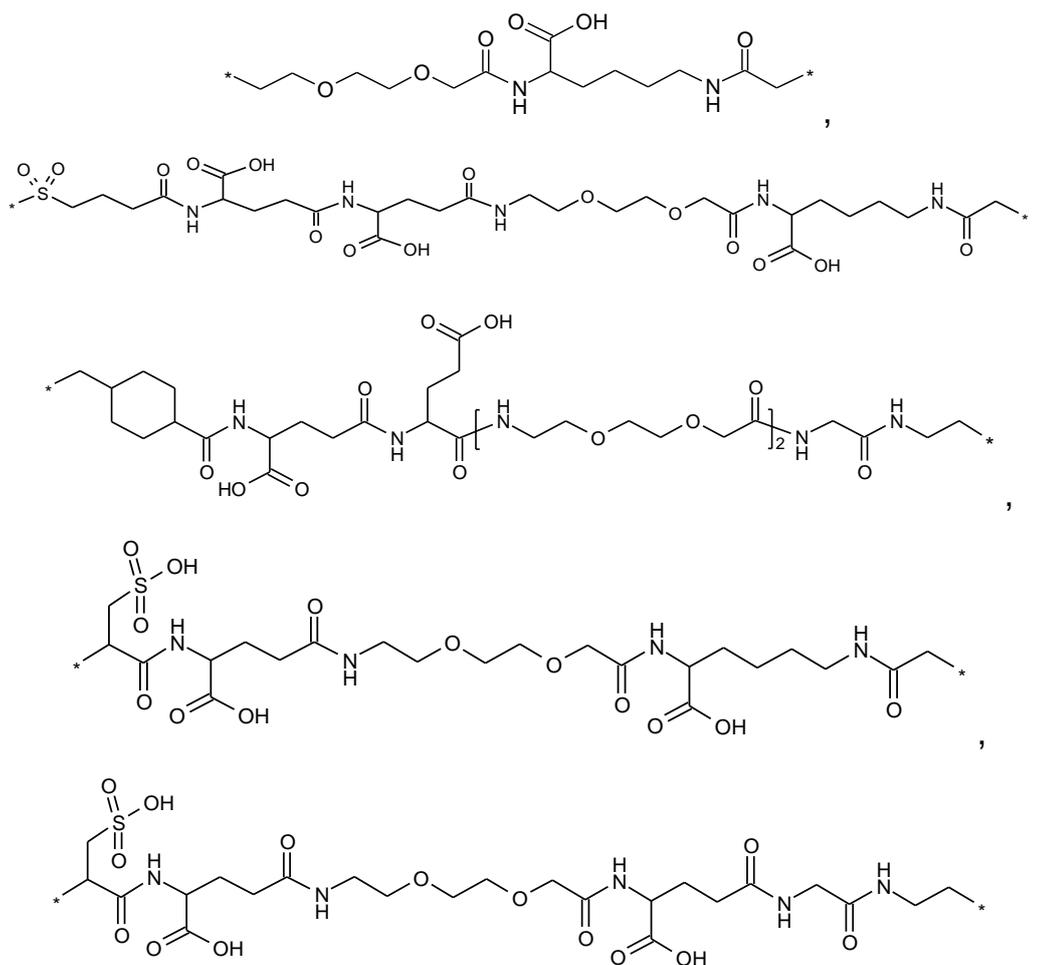




em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

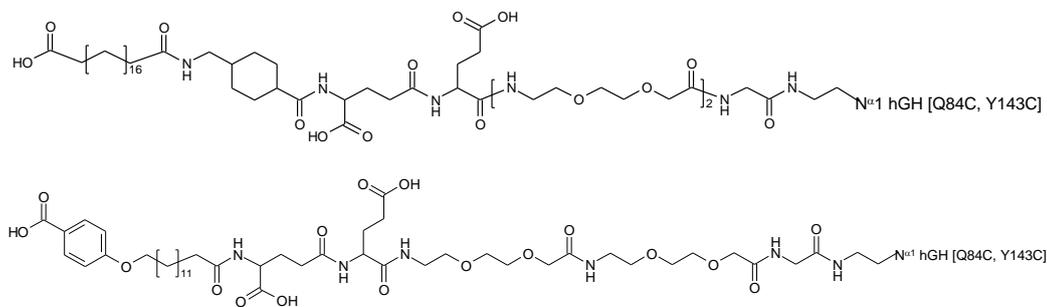
[000165] Em uma modalidade adicional B é selecionado de

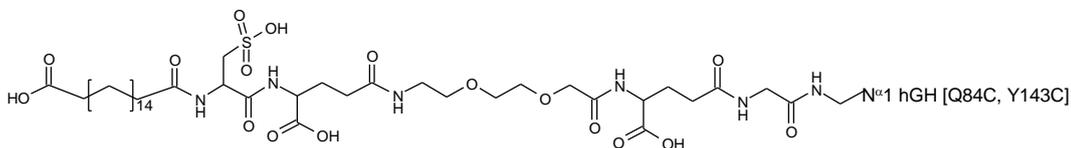
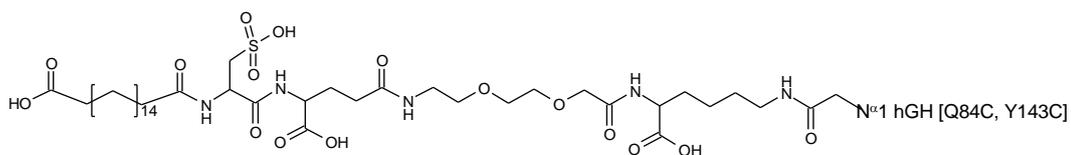




[000166] Em uma modalidade adicional A através de B é ligado ao resíduo glutamina na posição correspondendo à posição 40, posição 141 em SEQ ID NO:1 ou ao resíduo N-terminal do composto de hormônio do crescimento.

[000167] Em uma modalidade adicional o conjugado de GH é selecionado de





[000168] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento em que o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional,

B representa um espaçador hidrofílico ligado ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

W é um grupo químico ligando A e B, e

A representa um resíduo de ligação à albumina; e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000169] Em uma modalidade adicional GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, GH tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98% ou tal como pelo menos 99%, de identidade com hGH (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, as ditas identidades para hGH são acopladas a pelo menos 10%, tal como pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80%, da atividade de hormônio do crescimento de hGH conforme determinado

no ensaio I aqui. Qualquer uma das modalidades de identidade de sequência pode ser combinada com qualquer uma das modalidades de atividade, tal como um GH tendo pelo menos 80% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 60% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 90% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 40% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 95% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH, e assim por diante.

[000170] Em modalidades adicionais, o GH do conjugado tem uma ligação dissulfeto adicional e uma mutação de Cys única selecionada de qualquer uma de uma mutação de Cys única nas regiões terminal N, H1, H2, L2 ou H3 de GH. Em tais modalidades adicionais, a mutação de Cys única é posicionada no terminal N, a mutação sendo qualquer uma de T3C, P5C, S7C ou em H1 (correspondendo a AA 9-35), a mutação sendo qualquer uma de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C ou em L1 (correspondendo a AA36-71), a mutação sendo qualquer uma de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C ou preferivelmente qualquer uma de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C ou em H2, L2 ou H3 (correspondendo a AA 72-98, AA 99-106 e AA 107-127), a mutação sendo qualquer uma de E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1), ou em L3 ou H4 (correspondendo a AA128-154 e AA155-184). Em L3 e H4 (128-154 e AA155-184) a mutação sendo qualquer uma de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C ou no terminal C a mutação sendo qualquer uma de E186C G187C G190C.

[000171] Se a mutação de Cys única estiver presente em uma variante de hGH a mutação está localizada em resíduos de

aminoácido correspondentes.

[000172] Modalidades adicionais incluem conjugados de GH tendo uma ligação dissulfeto adicional e uma mutação de cys única em GH é selecionada de qualquer uma 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 e G190C, tal como qualquer uma de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1).

[000173] Em modalidades adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de AA 93-106 em hGH ou resíduos correspondentes em variantes de hGH. Em modalidades especificadas adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 ou AA 99-103 ou resíduos correspondentes.

[000174] Em modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional pode ser uma ligação dissulfeto adicional entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro de segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[000175] Em uma modalidade adicional o GH compreende um mutante de cys única e uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

[000176] Em uma modalidade adicional o GH compreende um mutante de cys única e uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional que conecta um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154, com um segmento de

hélice, tal como hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98).

[000177] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende um mutante de cys única e uma ligação dissulfeto adicional ligando a hélice 2 (correspondendo a AA 72-98) com a alça 3 (correspondendo a AA 128-154).

[000178] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende um mutante de cys única e uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C in SEQ ID NO: 1.

[000179] Em uma modalidade adicional a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1).

[000180] Em uma modalidade adicional o GH do conjugado compreende um mutante de cys única e uma ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições

correspondendo 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 e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

[000181] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional está entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C e/ou R94C/D107C em SEQ ID NO: 1.

[000182] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido e posições correspondendo 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 e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

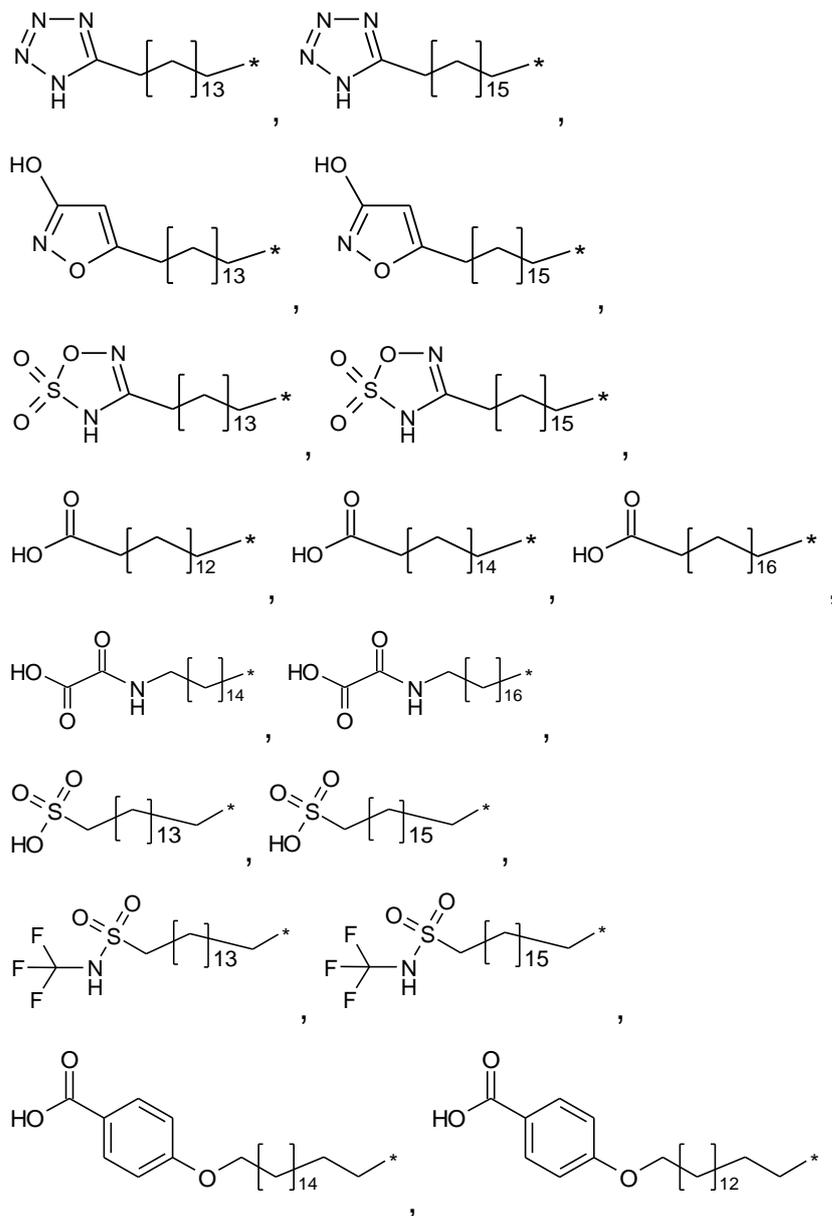
[000183] Em uma modalidade adicional a ligação dissulfeto adicional entre um dos pares de aminoácido em posições correspondendo a S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C e/ou S85C/S144C em SEQ ID NO: 1.

[000184] Em uma modalidade adicional o GH compreende uma mutação de cisteína única em L2 e uma ligação dissulfeto adicional que conecta um segmento de alça, tal como de resíduos de aminoácido 128-154 (H3), com um segmento de hélice, tal como hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98).

[000185] Em uma modalidade o GH compreende uma combinação de mutações selecionadas do grupo que segue 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 e C102C/S85C/S144C.

[000186] Em uma modalidade adicional A é selecionado de



em que \* significa a ligação a B através de W.

[000187] Em uma modalidade adicional W tem a fórmula

-W<sub>7</sub>-Y-

em que

Y é  $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{C}_{3-10}\text{-cicloalquila}-\text{W}_8-$  ou uma ligação de valência,

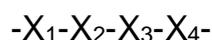
17 é 0-6,

$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s_3$  é 0 ou 1,

$W_8$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s_4$  é 0 ou 1.

[000188] Em modalidades adicionais B compreende ou consiste em um ou mais motivos OEG e/ou gama-Glu conforme descrito acima.

[000189] Em uma modalidade adicional B tem a fórmula



em que

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

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

$X_3$  é  $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ ,

$l_1, l_2, l_3, l_4, l_5$  e  $l_6$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m_1, m_3, m_4, m_6$  e  $m_7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m_2$  e  $m_5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n_1, n_2, n_3$  e  $n_4$  são independentemente selecionados de 0-16,

$F$  é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência, em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  ou  $C_{1-6}$ -alquila,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou heterila; em que os grupos alquila, arila e heterila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

D1, D2, E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>2</sub> é 0 ou 1;

W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que s<sub>1</sub> é 0 ou 1 e o grupo C<sub>1-6</sub>alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000190] Em uma modalidade adicional I1, I2, I3, I4, I5 e I6 são independentemente 0-6.

[000191] Em uma modalidade adicional m1, m3, m4, m6 e m7 são independentemente 0-6.

[000192] Em uma modalidade adicional m2 e m5 são independentemente 0-10.

[000193] Em uma modalidade adicional n1, n2, n3 e n4 são independentemente 0-10.

[000194] Em uma modalidade adicional D1 e D2 são

independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

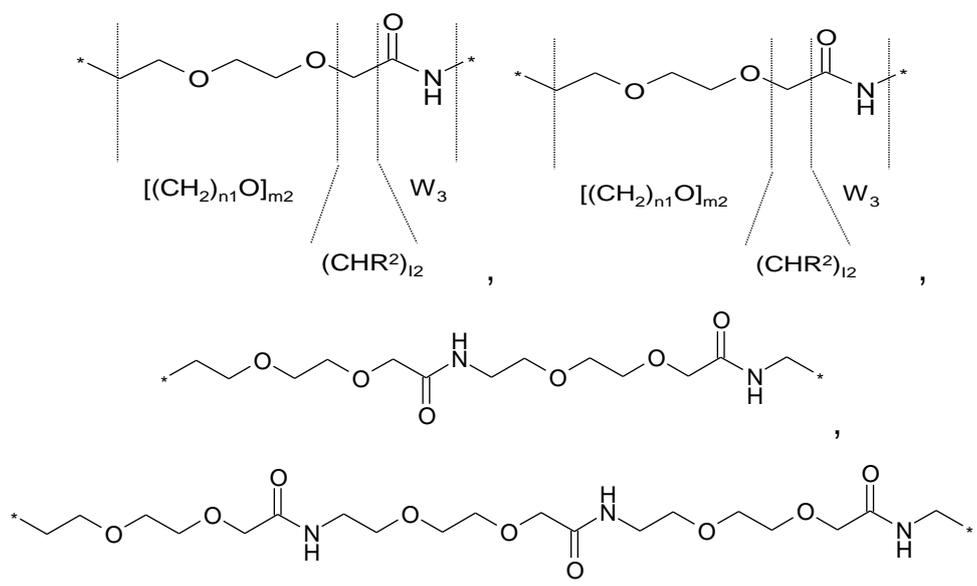
[000195] Em uma modalidade adicional E1 e E2 são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

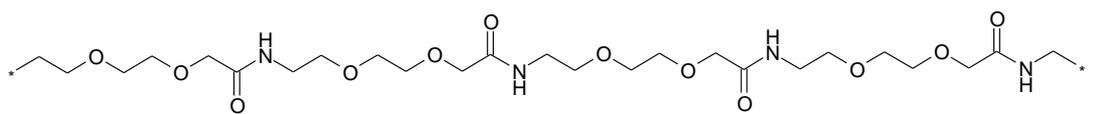
[000196] Em uma modalidade adicional W<sub>1</sub> a W<sub>8</sub> são independentemente selecionados do grupo consistindo em -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000197] Em uma modalidade adicional R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo C<sub>1-6</sub>-alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

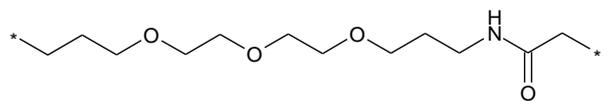
[000198] Em uma modalidade adicional -{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>E1]<sub>m2</sub>-[(CHR<sup>2</sup>)<sub>l2</sub>-W<sub>3</sub>]<sub>m3</sub>}<sub>n2</sub>- e

-{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>E2]<sub>m5</sub>-[(CHR<sup>4</sup>)<sub>l4</sub>-W<sub>5</sub>]<sub>m6</sub>}<sub>n4</sub>-, em que E1 e E2 são -O-, são selecionados de





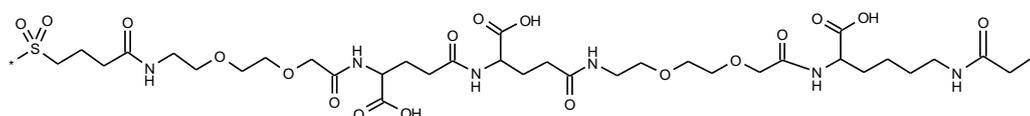
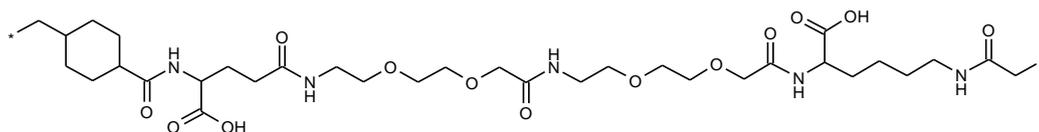
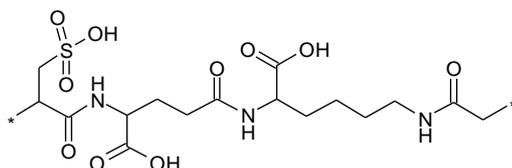
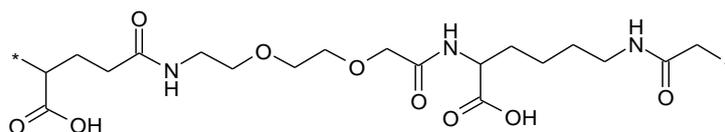
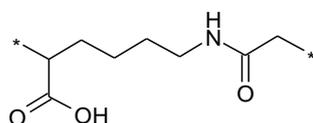
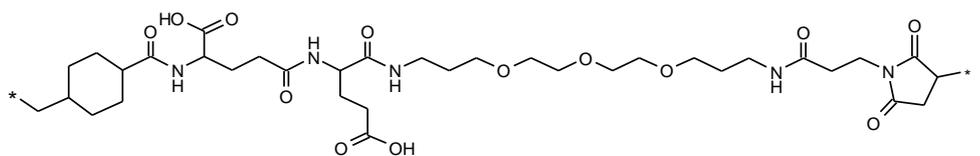
e

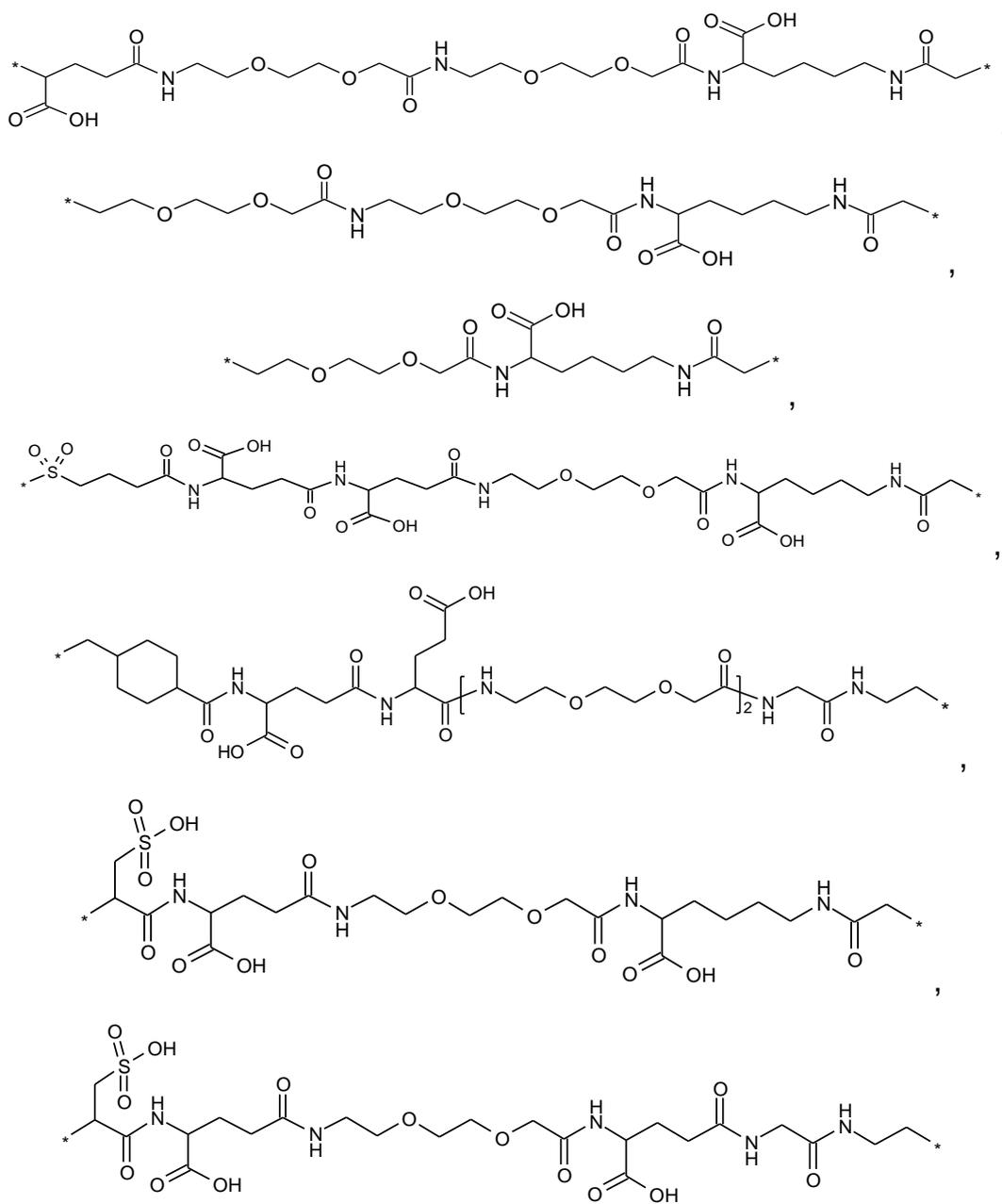


em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

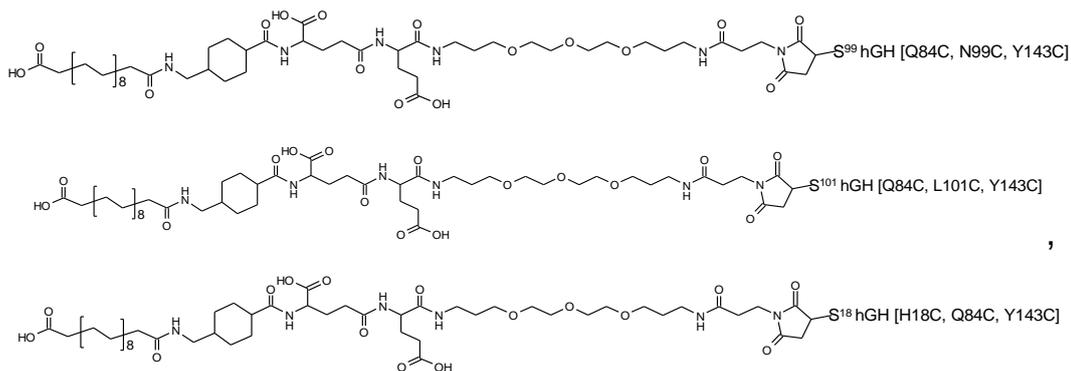
[000199] Em uma modalidade adicional, X<sub>4</sub> é uma ligação de valência e W<sub>6</sub> é selecionado de qualquer um de pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH em que (\*) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a GH.

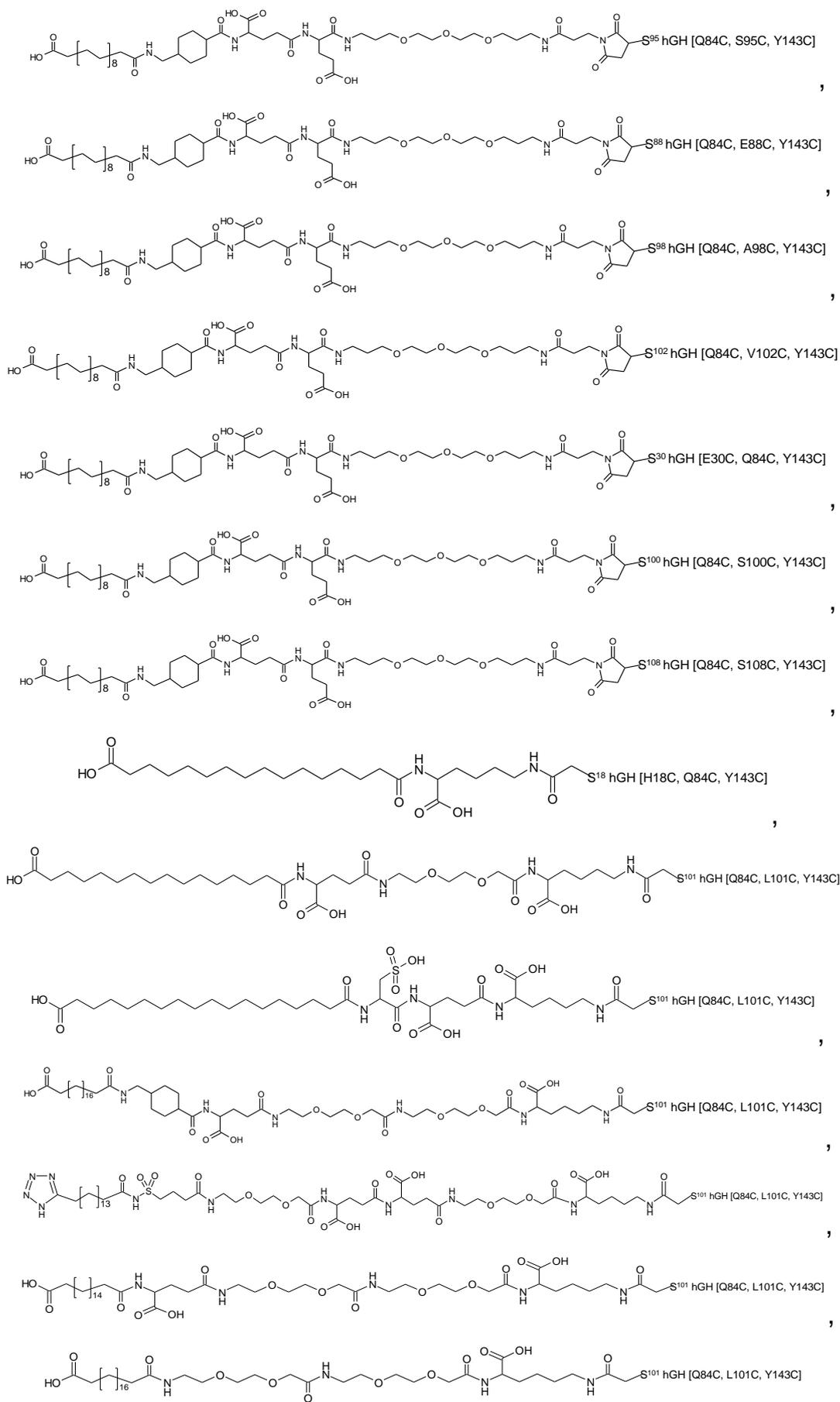
[000200] Em uma modalidade adicional B é selecionado de

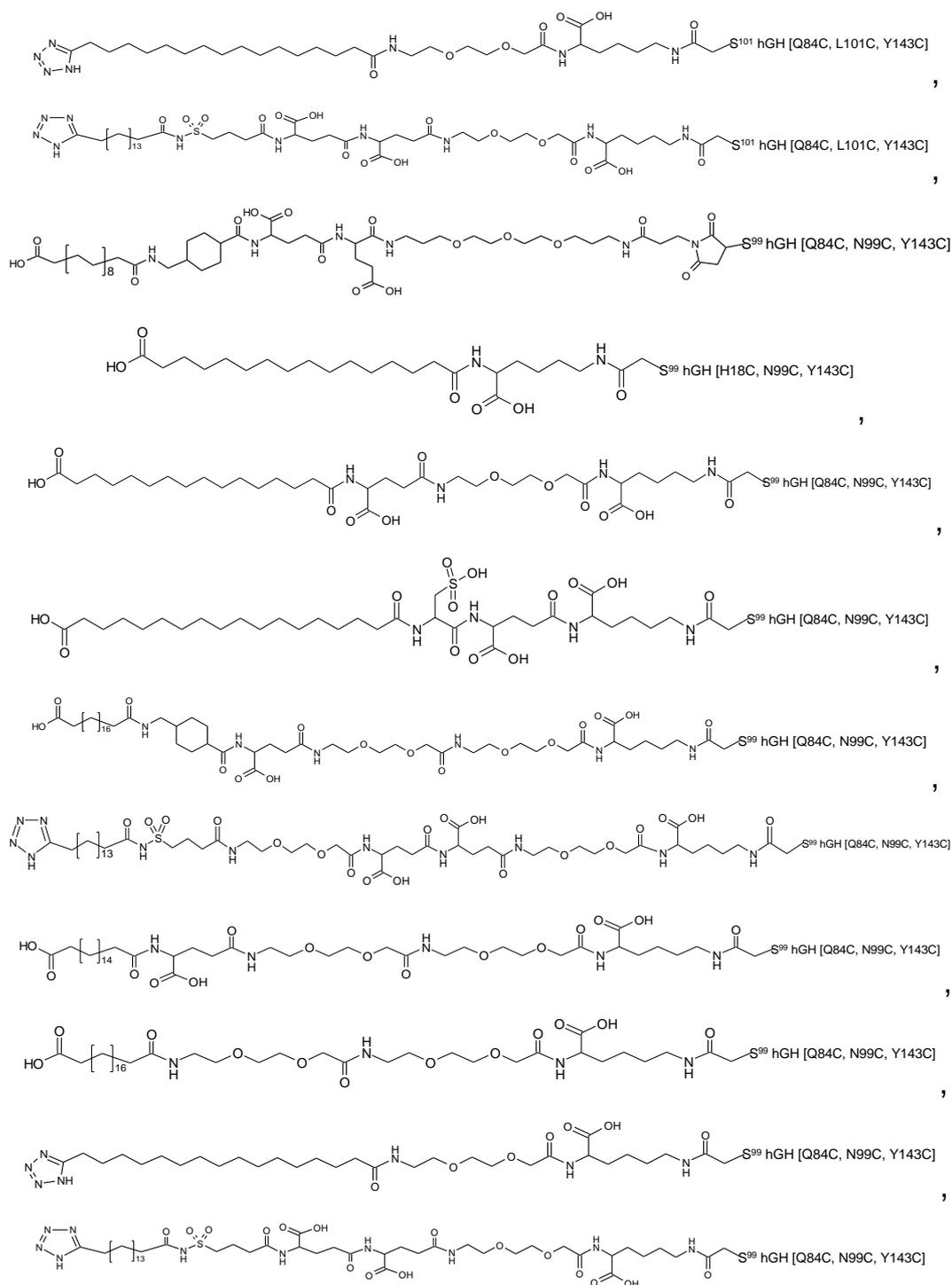




[000201] Em uma modalidade adicional o conjugado de GH é selecionado de







[000202] Tipicamente, o conjugado da presente invenção tem um resíduo de ligação à albumina (A) ligado através de um espaçador hidrofílico (B), tal como um espaçador hidrofílico (B), ao composto de hormônio do crescimento (GH).

[000203] No entanto, o composto de hormônio do crescimento (GH) pode ser ligado a dois resíduos de ligação à albumina através de um

espaçador hidrofílico.

[000204] Desta maneira, em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento da fórmula (II):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única,

B e B' são independentemente espaçadores hidrofílicos ligados ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

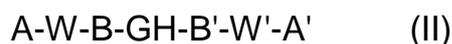
W é um grupo químico ligando A e B,

W' é um grupo químico ligando A' e B',

A e A' representam independentemente um resíduo de ligação à albumina, e

seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000205] Ainda, outro aspecto da presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (II):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma ponte dissulfeto adicional,

B e B' são independentemente espaçadores hidrofílicos,

W é um grupo químico ligando A e B,

W' é um grupo químico ligando A' e B',

A e A' representam independentemente um resíduo de ligação à albumina, e

seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000206] Um aspecto adicional da presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento da fórmula (II):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional,

B e B' são independentemente espaçadores hidrofílicos ligados ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

W é um grupo químico ligando A e B,

W' é um grupo químico ligando A' e B',

A e A' representam independentemente um resíduo de ligação à albumina, e

seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000207] No conjugado de fórmula (II) conforme descrito acima W' é selecionado dos mesmos grupos que W, A' é selecionado dos mesmos grupos que A e B' é selecionado dos mesmos grupos que B, e deve ser compreendido que W e W', A e A' e B e B' são independentemente selecionados de qualquer um dos respectivos grupos conforme aqui definido. Desta maneira, quaisquer modalidades de W, A e B aqui são também modalidades de W', A' e B'. Ainda, qualquer uma das modalidades descritas aqui se refere independentemente a ambos os conjugados de fórmulas (I) e (II), bem como o aspecto amplo e suas modalidades quando adequado.

[000208] As modalidades acima, bem como as modalidades a serem descritas abaixo, devem ser vistas como se referindo a qualquer um dos aspectos descritos aqui bem como qualquer uma das modalidades descritas aqui a menos que seja especificado que uma modalidade refira-se a um certo aspecto ou aspectos da presente invenção.

[000209] Em uma modalidade GH é uma variante de hGH, em que uma variante é compreendida ser o composto obtido substituindo um ou mais resíduos de aminoácido na sequência de hGH com outro aminoácido natural ou não natural; e/ou adicionando um ou mais aminoácidos naturais ou não naturais à sequência de hGH; e/ou

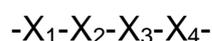
deletando um ou mais resíduos de aminoácido da sequência de hGH, em que qualquer uma dessas etapas pode ser opcionalmente seguida por derivatização adicional de um ou mais resíduos de aminoácido.

[000210] Em uma modalidade adicional GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1). Em modalidades adicionais, GH tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 95%, tal como pelo menos 96%, tal como pelo menos 97%, tal como pelo menos 98% ou tal como pelo menos 99%, de identidade com a SEQ ID NO:1. Em modalidades adicionais, as ditas identidades com hGH são acopladas a pelo menos 10%, tal como pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80%, da atividade de hormônio do crescimento de hGH conforme determinado no ensaio I aqui. Qualquer uma das modalidades de identidade de sequência pode ser combinada com qualquer uma das modalidades da atividade, tal como um GH tendo pelo menos 80% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 60% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 90% de identidade com hGH e acoplado a pelo menos 40% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; um GH tendo pelo menos 95% de identidade com GH e acoplado a pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH; e assim por diante.

[000211] Em uma modalidade adicional GH é hGH (SEQ ID NO:1).

[000212] Em modalidades adicionais, B compreende ou consiste em um ou mais motivo(s) OEG e/ou gama-Glu conforme acima descrito.

[000213] Em uma modalidade adicional do conjugado de fórmula (I) ou (II), o espaçador hidrofílico B tem a fórmula



em que

$X_1$  é  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2^-}$ ,

$X_2$  é  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4^-}$ ,

$X_3$  é  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7^-}$ ,

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2^-$ ,

$I1$ ,  $I2$ ,  $I3$ ,  $I4$ ,  $I5$  e  $I6$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m1$ ,  $m3$ ,  $m4$ ,  $m6$  e  $m7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m2$  e  $m5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n1$ ,  $n2$ ,  $n3$  e  $n4$  são independentemente selecionados de 0-16,

$F$  é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência, em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  ou  $C_{1-6}$ -alquila,

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-C(O)OH$ ,

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

$D1$ ,  $D2$ ,  $E1$  e  $E2$  são independentemente selecionados de  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  ou uma ligação de valência; em que  $R^6$  e  $R^7$  representam independentemente hidrogênio ou  $C_{1-6}$ -alquila,

$W_1$  a  $W_5$  são independentemente selecionados de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s2$  é 0 ou 1,

$W_6$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-$

CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-,  
 , -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -  
 C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou  
 uma ligação de valência; em que s1 é 0 ou 1 e o grupo alquila é  
 opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -  
 NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou

-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de  
 ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000214] Em uma modalidade adicional W<sub>1</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -  
 S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>1</sub> é  
 selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-.

[000215] Em uma modalidade adicional W<sub>2</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -  
 S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>2</sub> é  
 selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-.

[000216] Em uma modalidade adicional W<sub>3</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -  
 S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>3</sub> é  
 selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-.

[000217] Em uma modalidade adicional W<sub>4</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -  
 S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>4</sub> é  
 selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-.

[000218] Em uma modalidade adicional W<sub>5</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -  
 S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>5</sub> é  
 selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-.

[000219] Em uma modalidade adicional W<sub>6</sub> é selecionado de -  
 C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -

NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>. Tipicamente, W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>- ou -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila.

[000220] Em uma modalidade adicional, D1, D2, F todos são ligações de valência, I<sub>6</sub> é 0 e W<sub>6</sub> é selecionado de qualquer um de pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a GH.

[000221] Em uma modalidade adicional R<sup>1</sup> é selecionado de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH. Tipicamente, R<sup>1</sup> é selecionado de -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000222] Em uma modalidade adicional R<sup>2</sup> é selecionado de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH. Tipicamente, R<sup>2</sup> é selecionado de -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000223] Em uma modalidade adicional R<sup>3</sup> é selecionado de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH. Tipicamente, R<sup>3</sup> é selecionado de -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000224] Em uma modalidade adicional R<sup>4</sup> é selecionado de

hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH. Tipicamente, R<sup>4</sup> é selecionado de -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000225] Em uma modalidade adicional R<sup>5</sup> é selecionado de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH. Tipicamente, R<sup>5</sup> é selecionado de -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000226] Em uma modalidade adicional E1 é selecionado de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)-ou uma ligação de valência. Tipicamente, E1 é selecionado de -O-.

[000227] Em uma modalidade adicional E2 é selecionado de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)-, ou uma ligação de valência. Tipicamente, E2 é selecionado de -O-.

[000228] Em uma modalidade adicional E1 e E2 são ambos -O-.

[000229] Em uma modalidade adicional E1 e E2 são ambos -N(R<sup>6</sup>)-.

[000230] Em uma modalidade adicional F é fenila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência.

[000231] Em uma modalidade adicional D1 é selecionado de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)-ou uma ligação de valência. Tipicamente, D1 é selecionado de -N(R<sup>6</sup>)-.

[000232] Em uma modalidade adicional D2 é selecionado de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)-ou uma ligação de valência. Tipicamente, D1 é selecionado de -N(R<sup>6</sup>)-.

[000233] Em uma modalidade adicional I1 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000234] Em uma modalidade adicional I2 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3,

4, 5 ou 6.

[000235] Em uma modalidade adicional I3 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000236] Em uma modalidade adicional I4 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000237] Em uma modalidade adicional I5 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000238] Em uma modalidade adicional I6 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000239] Em uma modalidade adicional m1 é 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000240] Em uma modalidade adicional m2 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10.

[000241] Em uma modalidade adicional m3 é 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000242] Em uma modalidade adicional m4 é 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000243] Em uma modalidade adicional m5 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10.

[000244] Em uma modalidade adicional m6 é 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000245] Em uma modalidade adicional m7 é 0-5, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000246] Em uma modalidade adicional n1 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

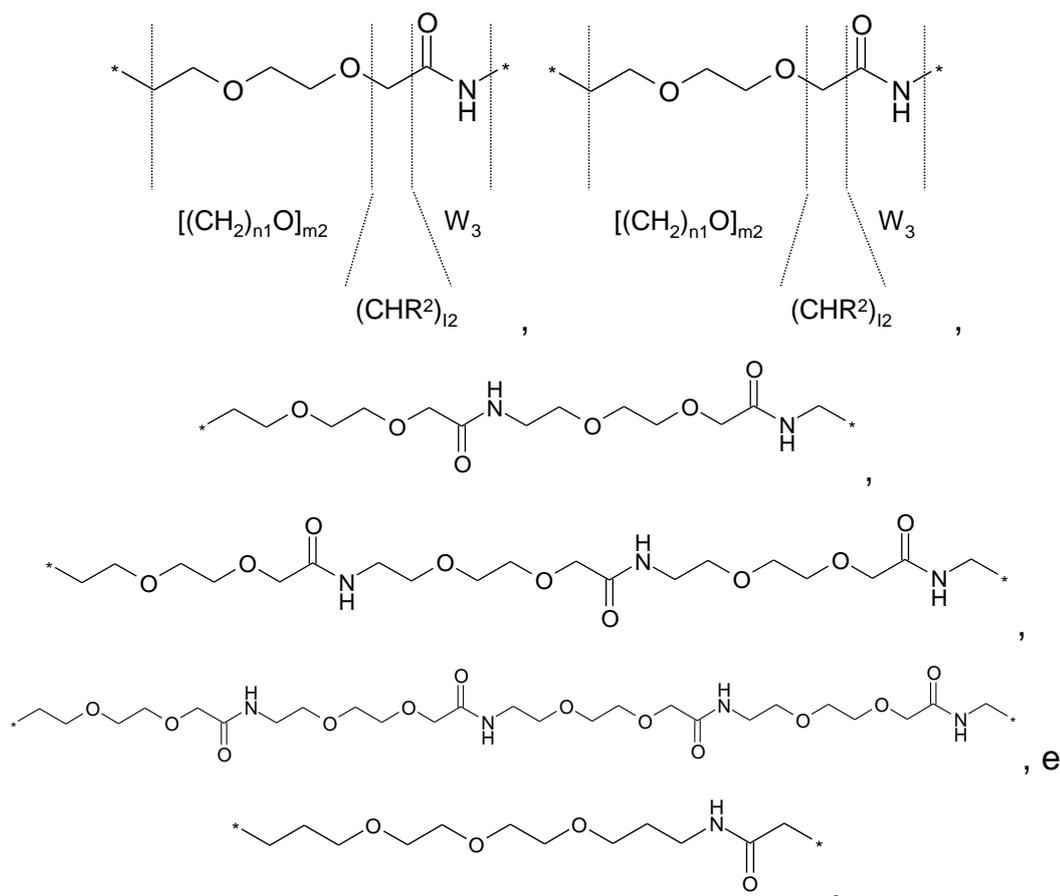
[000247] Em uma modalidade adicional n2 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000248] Em uma modalidade adicional n3 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[000249] Em uma modalidade adicional n4 é 0-10, tal como 0, 1, 2, 3,

4, 5 ou 6.

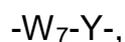
[000250] Em uma modalidade adicional  $X_1$  é  $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ - e  $X_2$  é  $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ -, em que  $-[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ - e  $-[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ - são selecionados de,



em que \* pretende indicar o ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

[000251] Em uma modalidade adicional o peso molar do dito espaçador hidrofílico está na faixa de 80 Daltons (D) a 1500 (D) ou na faixa de 300 D a 1100 D.

[000252] Em uma modalidade adicional  $W$  tem a fórmula



em que

$Y$  é  $-(CH_2)_{l7}-C_{3-10}$ -Cicloalquila- $W_8$ - ou uma ligação de valência,

I7 é 0-6,

W<sub>7</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>3</sub> é 0 ou 1,

W<sub>8</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s4</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>4</sub> é 0 ou 1.

[000253] Em uma modalidade de W Y é -(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-ciclo-hexila-W<sub>8</sub>-.

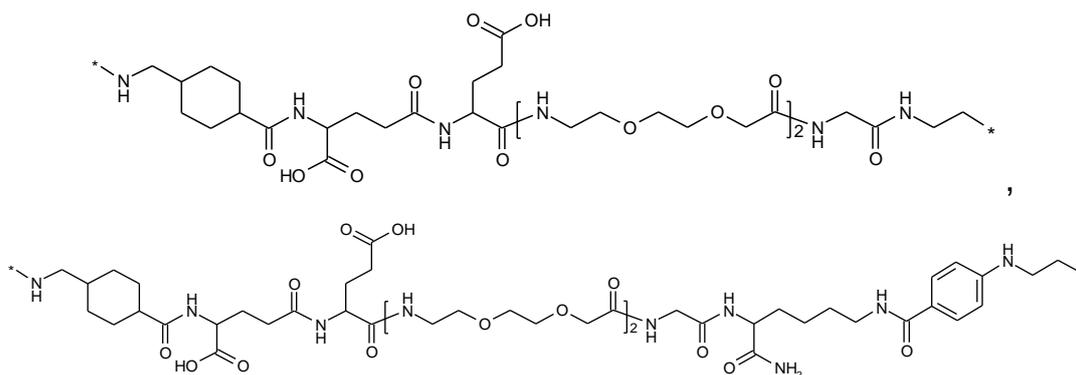
[000254] Em uma modalidade adicional Y é uma ligação de valência.

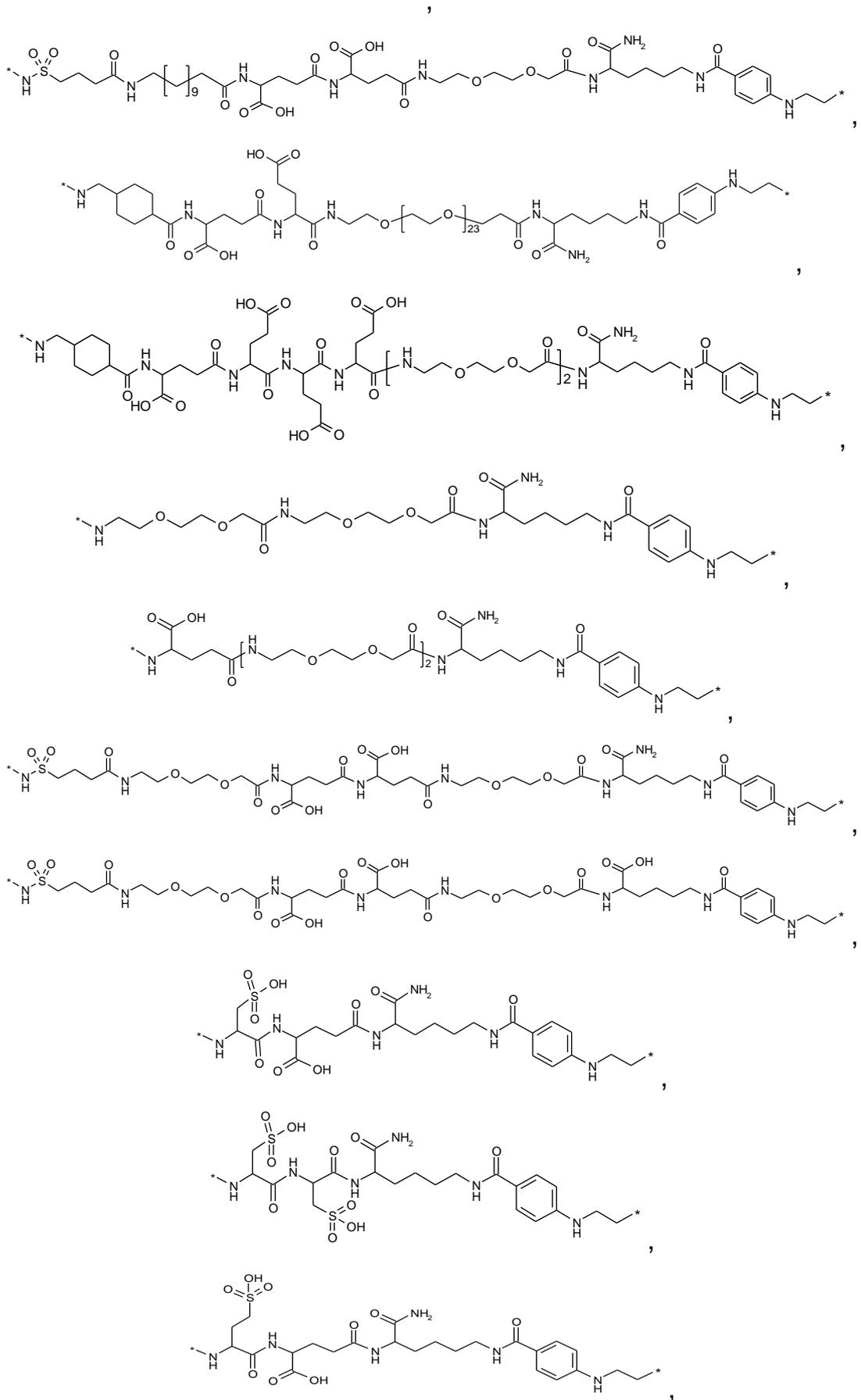
[000255] Em uma modalidade W<sub>7</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>7</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>.

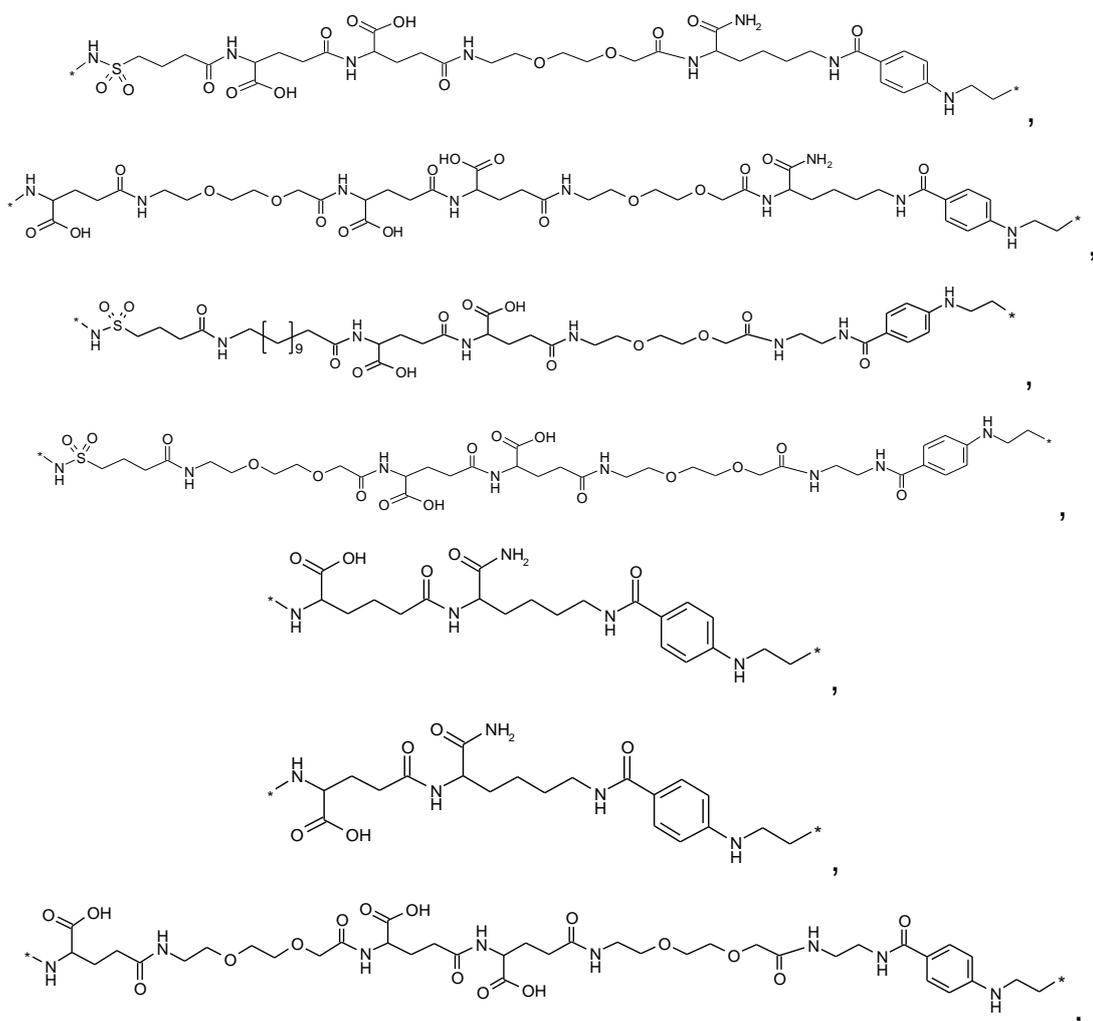
[000256] Em uma modalidade adicional W<sub>8</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- ou uma ligação de valência. Tipicamente, W<sub>8</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)- ou -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>.

[000257] Em uma modalidade adicional I7 é 0 ou 1.

[000258] Em uma modalidade adicional o espaçador hidrofílico B da presente invenção é selecionado de







em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

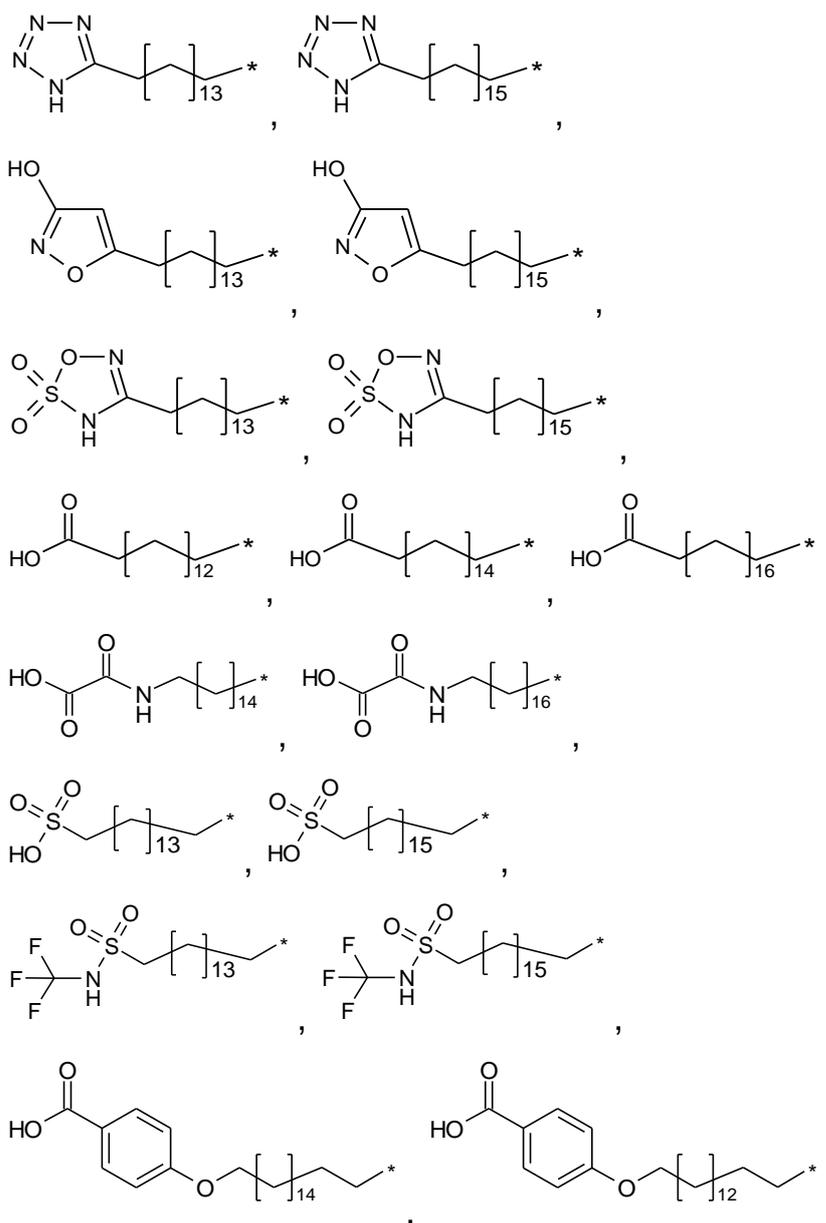
[000259] O resíduo de ligação à albumina (substituinte A na fórmula (I) ou (II) acima) ligado ao composto de hormônio do crescimento da presente invenção é um resíduo lipofílico, que se liga não covalentemente à albumina. Tipicamente, resíduo de ligação à albumina é negativamente carregado em pH fisiológico e tem uma afinidade de ligação com relação à albumina de soro humano que está abaixo de cerca de 10  $\mu$ M ou até mesmo abaixo de cerca de 1  $\mu$ M.

[000260] Em uma modalidade adicional do composto de hormônio do crescimento da presente invenção o resíduo de ligação à albumina é selecionado de um grupo alquila de cadeia retal, um grupo arila ramificado, um grupo que tem um grupo de ácido  $\omega$ -carboxílico.

Tipicamente, o resíduo de ligação à albumina tem de a partir de 6 a 40 átomos de carbono. Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina tem de a partir de 8 a 26 átomos de carbono. Em uma modalidade adicional, o resíduo de ligação à albumina tem de a partir de 8 a 20 átomos de carbono.

[000261] Em uma modalidade adicional A tem 14 a 26 átomos de carbono e compreende um grupo de ácido  $\omega$ -carboxílico. Em uma modalidade adicional A tem 14 a 26 átomos de carbono e compreende um isoéster do ácido  $\omega$ -carboxílico, tal como um tetrazol.

[000262] Em uma modalidade adicional A é seleccionado de



em que \* indica a ligação a B através de W.

[000263] O espaçador hidrofílico (B) é preferivelmente introduzido em uma posição do composto de hormônio do crescimento (GH) de uma maneira seletiva a fim de ser capaz de controlar se um ou dois resíduos de ligação à albumina (A) devem ser incorporados no composto de hormônio do crescimento. O espaçador hidrofílico (B) pode ser ligado a uma cadeia lateral de aminoácido do composto GH. Tal cadeia lateral de aminoácido pode ser uma cadeia lateral de aminoácido quimicamente modificada do composto GH. Outra cadeia lateral de aminoácido do tipo pode ser uma cadeia lateral de aminoácido enzimaticamente modificada do composto GH. Preferivelmente, uma transglutaminase é usada para introduzir um espaçador hidrofílico no resíduo glutamina na posição correspondendo à posição 40 ou posição 141 na SEQ ID NO:1. Outra maneira de seletivamente introduzir um espaçador hidrofílico é no resíduo N-terminal do composto de hormônio do crescimento, tal como hGH (SEQ ID NO:1).

[000264] No conjugado de hormônio do crescimento da fórmula (I) o fragmento A-W-B pode ser linear ou ramificado. Em uma modalidade, A-W-B não é um peptídeo linear.

[000265] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é preso ao resíduo glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID NO:1.

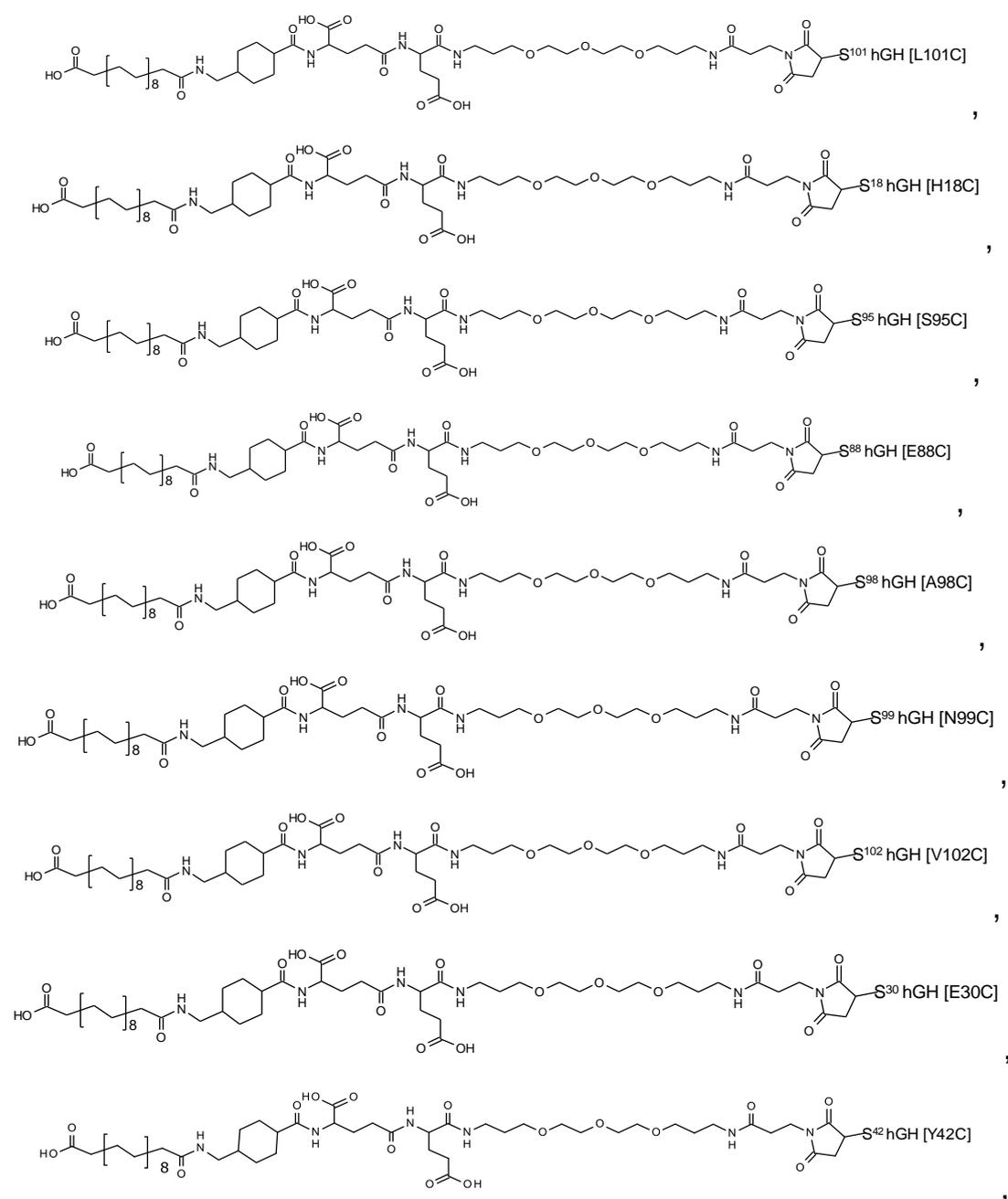
[000266] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é preso ao resíduo glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID NO:1.

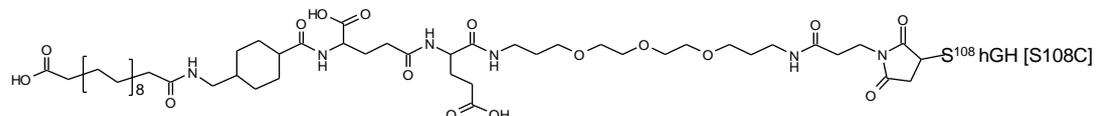
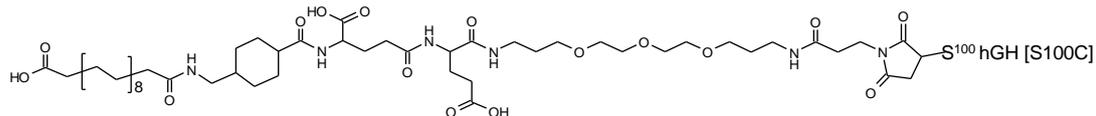
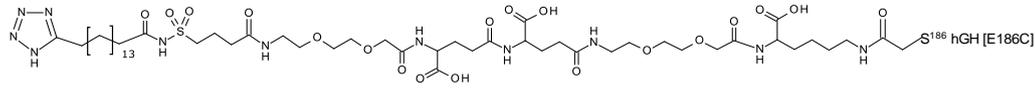
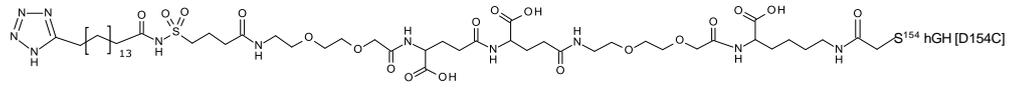
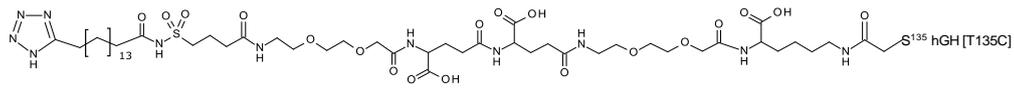
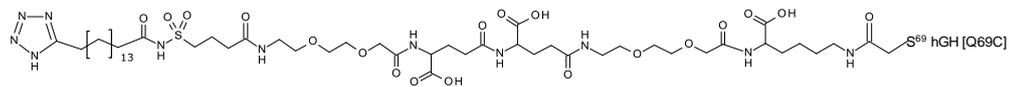
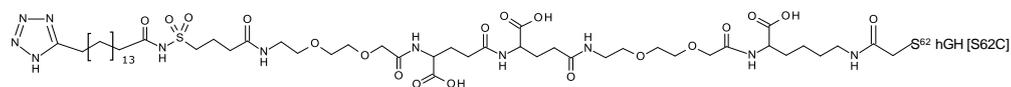
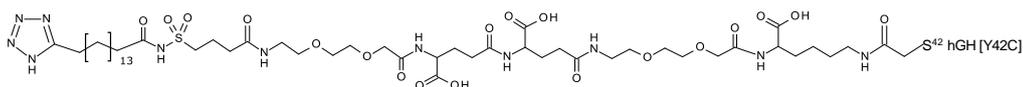
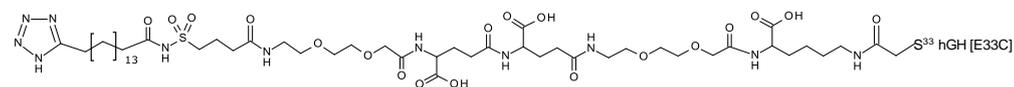
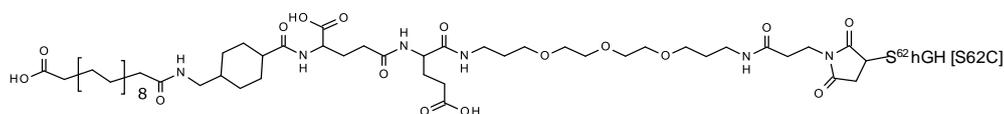
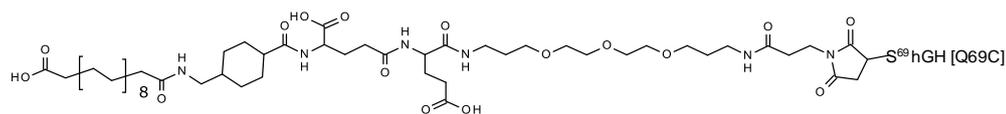
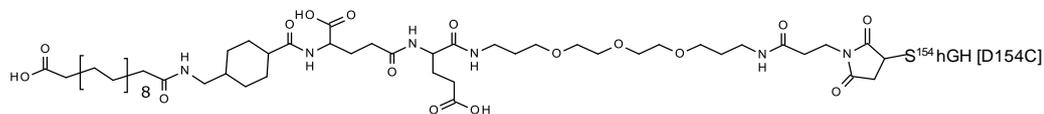
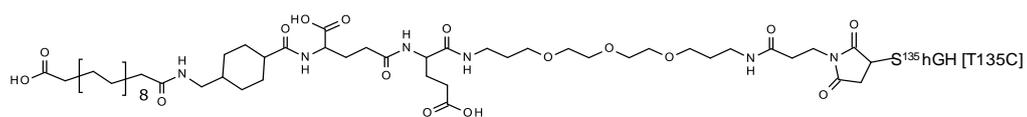
[000267] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é preso ao resíduo N-terminal do composto de hormônio do crescimento, tal como hGH

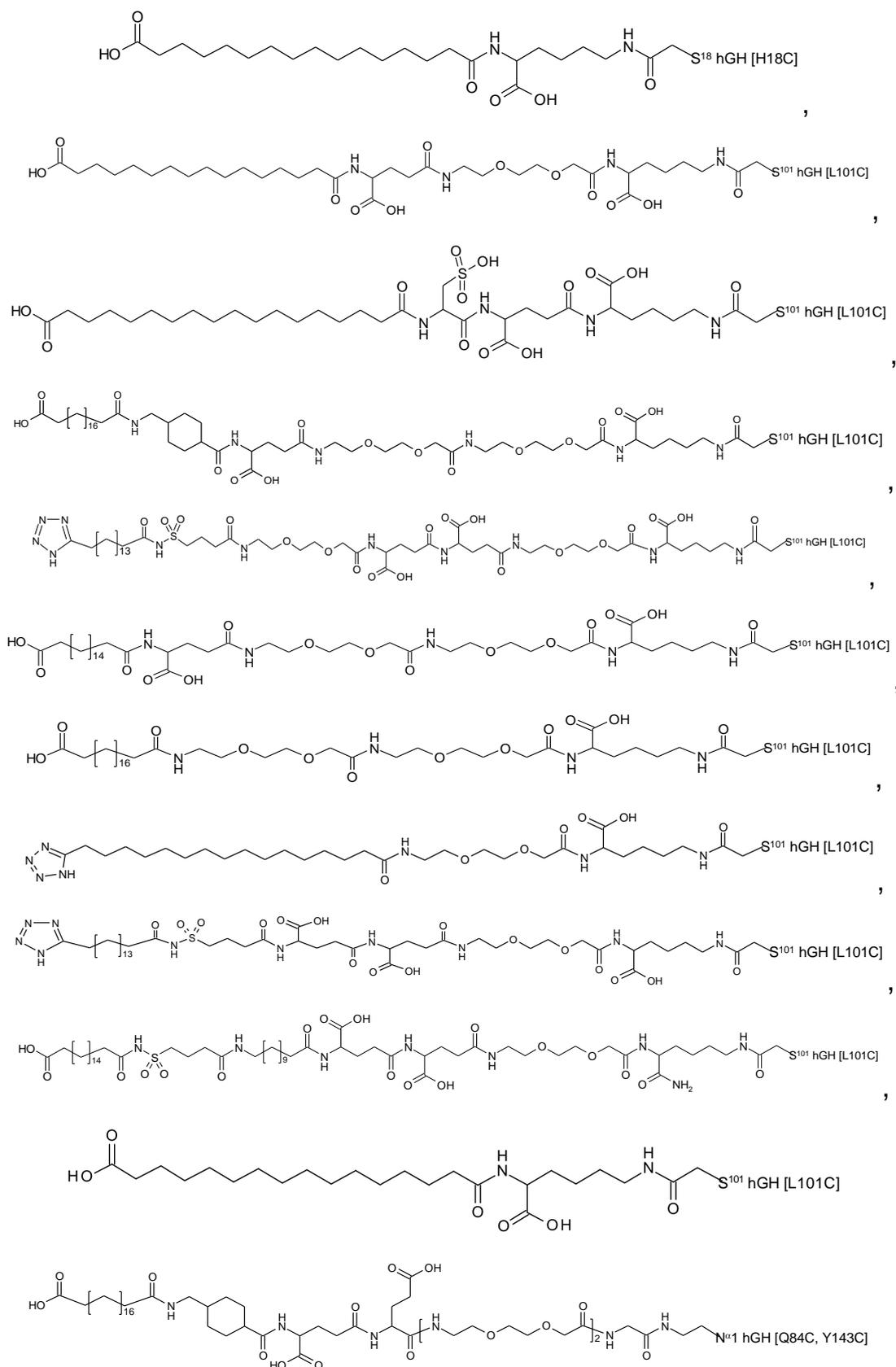
(SEQ ID NO:1).

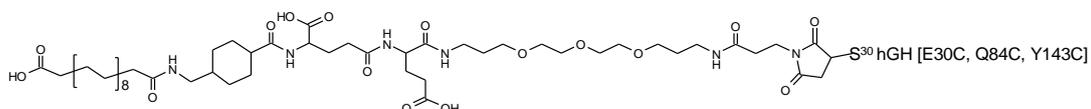
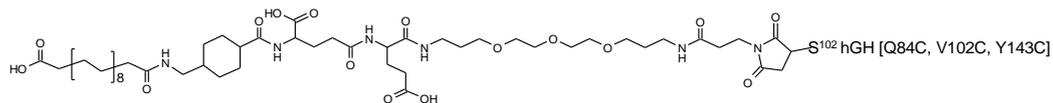
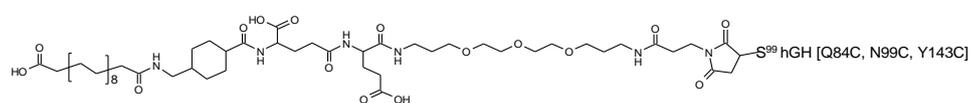
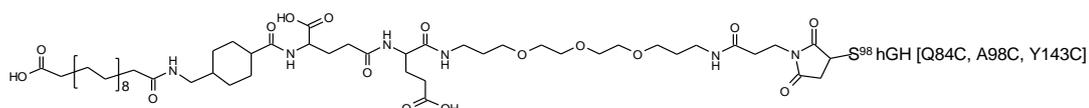
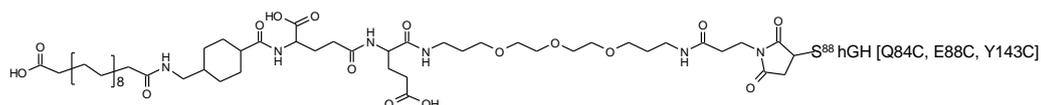
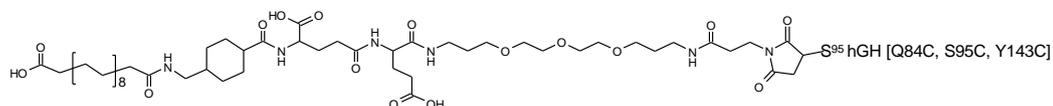
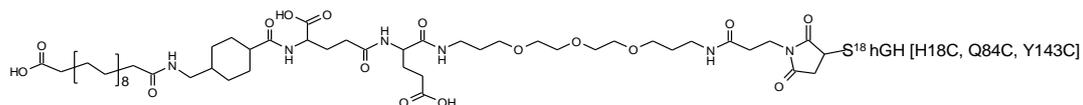
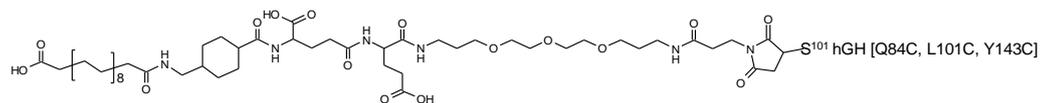
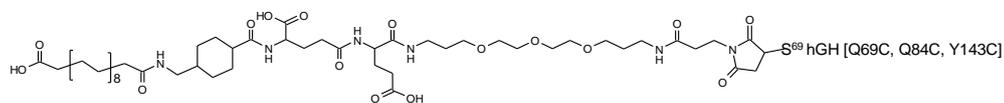
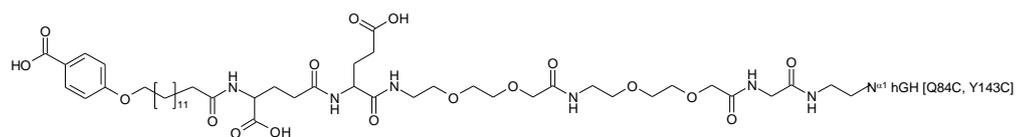
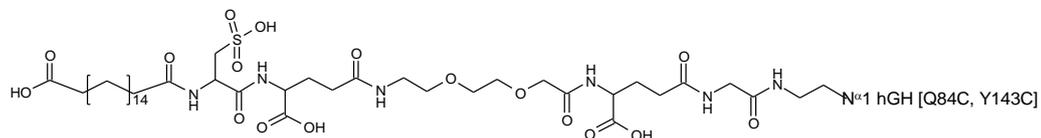
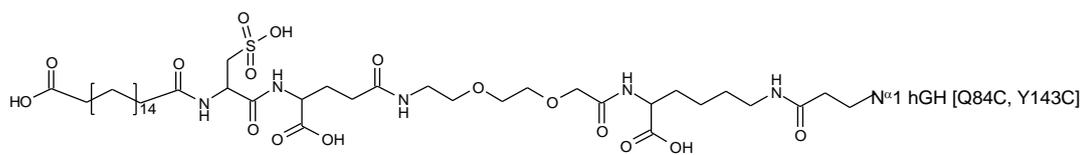
[000268] Em uma modalidade adicional o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é preso ao resíduo glutamina na posição correspondendo à posição 40, posição 141 e ao resíduo N-terminal do composto de hormônio do crescimento, tal como hGH (SEQ ID NO:1).

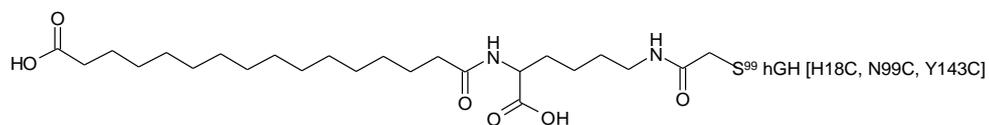
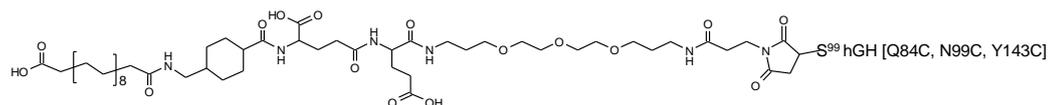
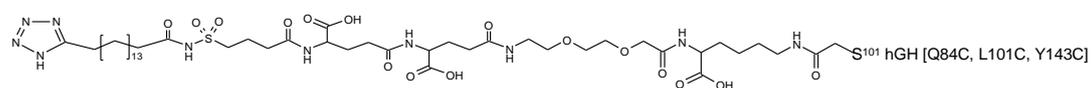
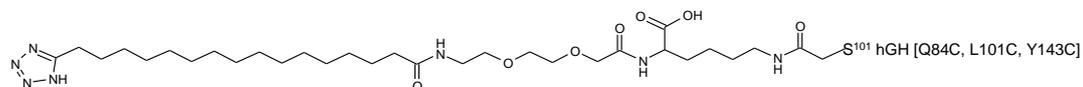
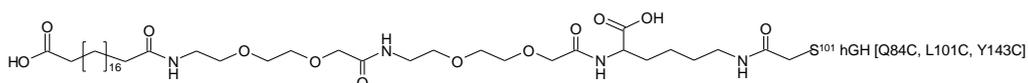
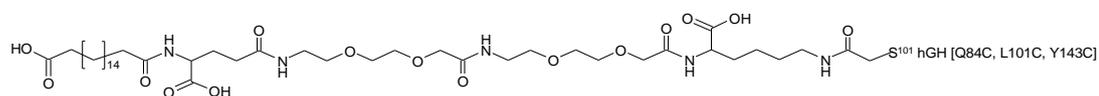
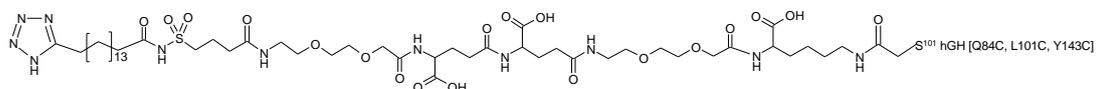
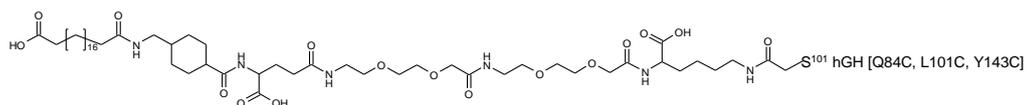
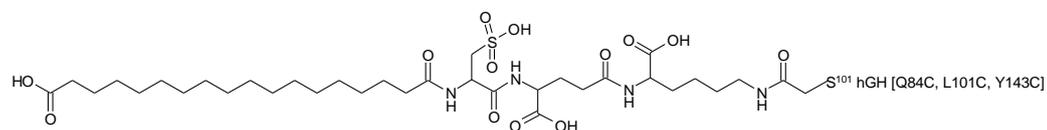
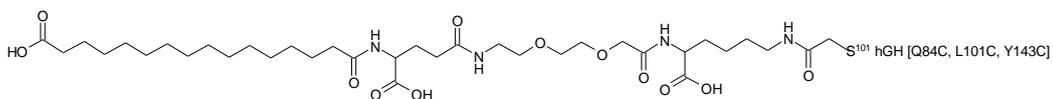
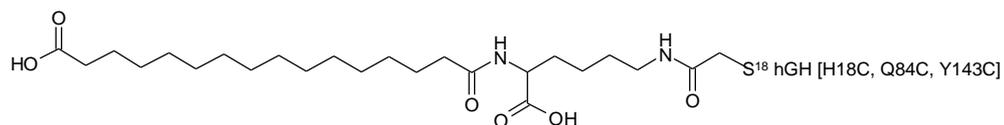
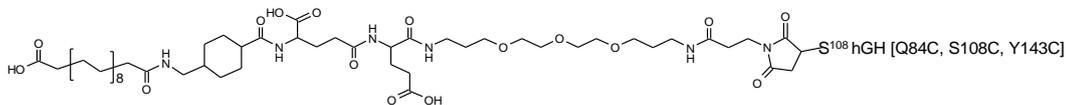
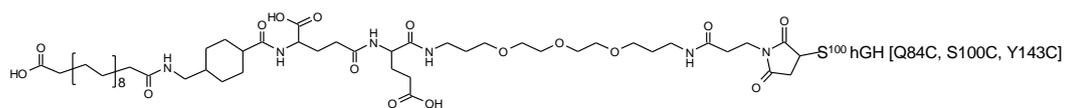
[000269] Os conjugados de hormônio do crescimento da presente invenção são selecionados de

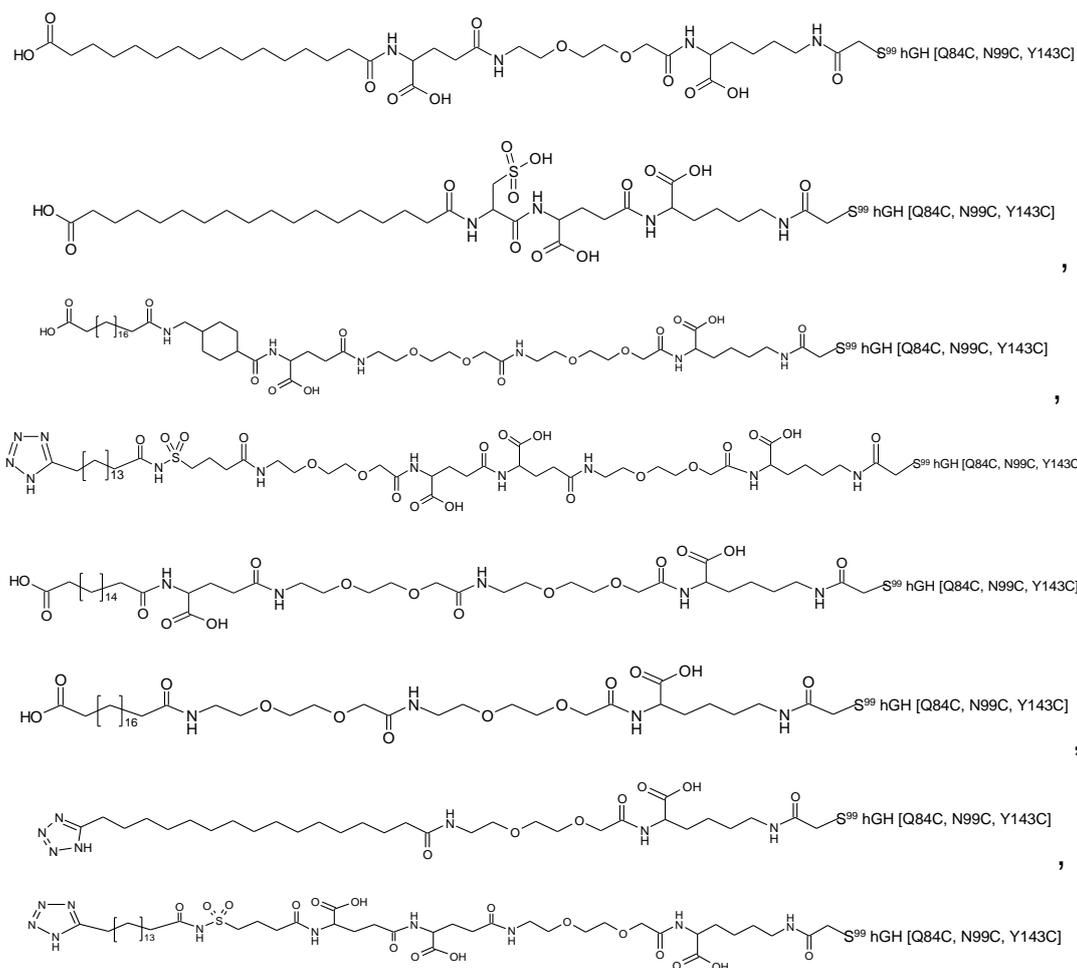












[000270] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a variantes de hormônio do crescimento tais como os compostos de hormônio do crescimento (GH) descritos aqui. As variantes de hormônio do crescimento podem ser úteis como agentes terapêuticos ou como intermediários na preparação de conjugados de hormônio do crescimento. Os compostos de hormônio do crescimento podem ser produzidos através de métodos recombinantes conhecidos na técnica ou conforme aqui descrito. Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento é solúvel.

[000271] Em um aspecto adicional a invenção se refere a uma composição compreendendo uma variante de hormônio do crescimento conforme aqui descrito.

[000272] Em uma modalidade a composição compreende uma variante de hormônio do crescimento compreendendo uma mutação

de cys única selecionada do grupo de: P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C.

[000273] Em uma modalidade da invenção a variante de hormônio do crescimento da composição tem uma mutação de Cys única no terminal N (AA 1-8), na Hélice 1, na Alça 1, na Hélice 2, na Alça 2 ou na Hélice 3 do composto de hormônio do crescimento.

[000274] Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada no terminal N, a mutação sendo qualquer uma de P5C, S7C. Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada em H1 (correspondendo a AA 9-35), tal como qualquer uma de D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C. Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada em L1 (correspondendo a AA36-71), a mutação sendo qualquer uma de K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C ou preferivelmente qualquer uma de Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C. Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada em H2 (AA 72-98), tal como qualquer uma de E88C, Q91C, S95C e A98C. Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada dentro de AA 99-127. Em uma modalidade a mutação de Cys única é posicionada em L2 (AA 99-106), tal como qualquer uma de N99C, S100C, L101C, V102C e Y103C. Em uma modalidade a mutação de Cys única está posicionada em H3 (AA 107-127), a mutação sendo qualquer uma de D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) ou em L3 ou H4 (correspondendo a AA128-154 e AA155-184) a mutação sendo qualquer uma de E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C ou no terminal C a mutação sendo qualquer uma de E186C G187C e G190C. Se a mutação de Cys única estiver presente em uma variante de hGH a mutação está localizada em resíduos de

aminoácido correspondentes. Em modalidades adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de AA 93-106 em hGH ou resíduos correspondentes em variantes de hGH. Em modalidades específicas adicionais a mutação de Cys única está localizada dentro de L2, tal como dentro de AA 99-106 ou AA 99-104 ou resíduos correspondentes.

[000275] Em uma modalidade a composição de acordo com a invenção compreende uma variante de hormônio do crescimento compreendendo uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional. Em uma modalidade a mutação de cys única é qualquer uma das mutações de cys únicas descritas acima. Em uma modalidade a mutação de cys única em GH é selecionada de qualquer uma 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 e G190C, tal como qualquer uma de; P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C de hGH (SEQ ID NO: 1) ou resíduos correspondentes. Em uma modalidade a ligação dissulfeto adicional é selecionada do grupo de pares de mutações de cisteína que seguem: 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, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C,

V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C e/ou V185C/S188C. Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento compreende uma mutação de cys única e uma ligação dissulfeto adicional selecionada dos pares de mutações de cisteína que seguem: S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C e/ou S85C/S144C.

[000276] Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento compreende uma mutação de cisteína única em L2 e uma ligação dissulfeto adicional que conecta um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154 (H3), com um segmento de hélice, tal como hélice B ou hélice 2 (correspondendo a AA 72-98). Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento compreende uma combinação de mutações selecionadas do grupo que segue: 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 e C102C/S85C/S144C. Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento compreende uma combinação de mutações selecionadas do grupo que segue: A98C/Q84C/Y143C, N99C/Q84C/Y143C, S101C/Q84C/Y143C, L101C/Q84C/Y143C e C102C/Q84C/Y143C. Em uma modalidade a variante de hormônio do crescimento compreende as mutações L101C, Q84C e Y143C.

[000277] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a um conjugado de hormônio do crescimento que compreende um composto de hormônio do crescimento (GH) ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para uso em terapia. Ainda, no conjugado de hormônio do crescimento da presente invenção GH, o resíduo de ligação à albumina e o espaçador hidrofílico são

selecionados de qualquer uma das modalidades acima. Em particular o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I) ou (II).

[000278] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um conjugado de hormônio do crescimento que compreende um composto de hormônio do crescimento (GH) ligado a um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico, ou um sal farmacêuticamente aceitável, em combinação com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[000279] O termo "identidade" como conhecido na técnica se refere a uma relação entre as sequências de duas ou mais proteínas, conforme determinado através de comparação das sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de relação de sequência entre proteínas, conforme determinado pelo número de compatibilidades entre os cordões de dois ou mais resíduos de aminoácido. "Identidade" mede a porcentagem de compatibilidades idênticas entre a menor de duas ou mais sequências com alinhamentos de lacuna (se algum) endereçados por um modelo matemático particular ou programa de computador (isto é, "algoritmos"). Identidade de proteínas relacionadas pode ser prontamente calculada por métodos conhecidos. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part 1, Griffin, A. M. e Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; e Carillo e outros, *SIAM J. Applied Math.*, **48**, 1073, (1988).

[000280] Métodos preferidos para determinação da identidade são planejados para fornecer a maior compatibilidade entre as sequências testadas. Métodos para determinar identidade são descritos em programas de computador publicamente disponíveis. Métodos de programa de computador preferidos para determinar identidade entre duas sequências incluem o pacote de programa GCG, incluindo GAP (Devereux e outros, *Nucl. Acid. Res.*, **12**, 387, (1984)); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul e outros, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, (1990)). O programa BLASTX está publicamente disponível do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (BLAST Manual, Altschul e outros, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul e outros, *supra*). O algoritmo Smith Waterman bem conhecido pode ser também usado para determinar identidade.

[000281] Por exemplo, usando o algoritmo de computador GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), duas proteínas para as quais a identidade de sequência percentual deve ser determinada são alinhadas para compatibilidade ótima de seus respectivos aminoácidos ("o alongamento compatível", conforme determinado pelo algoritmo). Uma penalidade de abertura de lacuna (que é calculada como 3 vezes a diagonal média; a "diagonal média" é a média da diagonal da matriz de comparação sendo usada; a "diagonal" é o score ou número designado a cada compatibilidade de aminoácido perfeita pela matriz de comparação particular) e uma penalidade de extensão de lacuna (que é geralmente {fração (1/10)} vezes a penalidade de abertura de lacuna), bem como uma matriz de comparação tal como PAM 250 ou BLOSUM 62 são usadas em conjunto com o algoritmo. Uma matriz de comparação padrão (vide Dayhoff e outros, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supl. 3, (1978) para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff e outros,

*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**, 10915-10919, (1992) para a matriz de comparação BLOSUM 62) é também usada pelo algoritmo.

[000282] Parâmetros preferidos para uma comparação de sequência de proteína incluem o que segue:

[000283] Algoritmo: Needleman e outros, *J. Mol. Biol*, **48**, 443-453, (1970); Matriz de Comparação: BLOSUM 62 da Henikoff e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10915-10919, (1992); Penalidade de Lacuna: 12, Penalidade de Comprimento de Lacuna: 4, Limiar de Similaridade: 0.

[000284] O programa GAP é útil com os parâmetros acima. Os parâmetros mencionados acima são os parâmetros *default* para comparações de proteína (junto com nenhuma penalidade para lacunas finais) usando o algoritmo GAP.

[000285] Os compostos da presente invenção têm propriedades farmacológicas aperfeiçoadas comparados com hormônio do crescimento não conjugado correspondente, que é também referido como o composto de origem. Exemplos de tais propriedades farmacológicas incluem meia-vida *in vivo* funcional, imunogenicidade, filtragem renal, proteção de protease e ligação à albumina.

[000286] O termo "meia-vida *in vivo* funcional" é usado em seu significado normal, isto é, o momento quando 50% da atividade biológica do GH ou conjugado de GH estão ainda presentes no corpo/órgão alvo ou o momento quando a atividade do GH ou conjugado de GH é 50% de seu valor inicial. Como uma alternativa para determinar a meia-vida *in vivo* funcional, "meia-vida no plasma *in vivo*" pode ser determinada, isto é, o momento quando 50% do GH ou conjugado de GH circulam no plasma ou corrente sanguínea antes de ser eliminado. Determinação de meia-vida no plasma é frequentemente mais simples do que determinação da meia-vida funcional e a magnitude de meia-vida no plasma é geralmente uma

boa indicação da magnitude de meia-vida *in vivo* funcional. Termos alternativos para meia-vida no plasma incluem meia-vida no soro, meia-vida em circulação, meia-vida circulatória, eliminação do soro, eliminação do plasma e meia-vida de eliminação.

[000287] O termo "aumentado" conforme usado com relação à meia-vida *in vivo* funcional ou meia-vida no plasma é usado para indicar que a meia-vida relevante do conjugado de GH é estatisticamente significativamente aumentada com relação àquela do GH parental, conforme determinado sob condições comparáveis. Por exemplo, a meia-vida relevante pode ser aumentada em pelo menos cerca de 25%, tal como pelo menos cerca de 50%, em pelo menos cerca de 100%, 200%, 250% ou 500%. Em uma modalidade, os compostos da presente invenção exibem um aumento na meia-vida de pelo menos cerca de 5 horas, preferivelmente pelo menos cerca de 24 horas, mais preferivelmente pelo menos cerca de 72 horas e mais preferivelmente pelo menos cerca de 7 dias, com relação à meia-vida do GH parental.

[000288] Medição de meia-vida no plasma *in vivo* pode ser realizada de várias maneiras conforme descrito na literatura. Um aumento em meia-vida do plasma *in vivo* pode ser quantificado como uma diminuição na eliminação (CL) (*clearance*) ou como um aumento em tempo de residência médio (MRT) (*Mean Residence Time*). GH conjugado da presente invenção para o qual a CL é diminuída para menos do que 70%, tal como menos do que 50%, tal como menos do que 20%, tal como menos do que 10%, da CL do GH parental conforme determinado em um ensaio adequado é dito ter uma meia-vida no plasma *in vivo* aumentada. GH conjugado da presente invenção para o qual MRT é aumentada para mais de 130%, tal como mais de 150%, tal como mais de 200%, tal como mais de 500%, do MRT do GH parental em um ensaio adequado é dito ter uma meia-vida no plasma *in vivo* aumentada. Eliminação e tempo de residência médio

pode ser avaliados em estudos farmacocinéticos padrão usando animais de teste adequados. Está dentro das capacidades de um versado na técnica escolher um animal de teste adequado para uma dada proteína. Testes em humano, com certeza, representam o teste final. Animais de teste adequados incluem ratos machos Sprague-Dawley, normais, camundongos e macacos cinomólogos. Tipicamente os camundongos e ratos são injetados em um bolo subcutâneo único, enquanto macacos podem ser injetados em um bolo subcutâneo único ou em uma dose iv única. A quantidade injetada depende do animal de teste. Subsequentemente, amostras de sangue são mantidas durante um período de um a cinco dias conforme apropriado para a avaliação de CL e MRT. As amostras de sangue são convenientemente analisadas através de técnicas ELISA.

[000289] O termo "imunogenicidade" de um composto se refere à habilidade do composto, quando administrado a um humano, em elicitar uma resposta imune prejudicial, seja humoral, celular ou ambas. Em qualquer subpopulação humana, pode haver indivíduos que exibem sensibilidade a proteínas administradas particulares. Imunogenicidade pode ser medida através da quantificação da presença de anticorpos de hormônio do crescimento e/ou células T responsivas a hormônio do crescimento em um indivíduo sensível, usando métodos convencionais conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o GH conjugado da presente invenção exibe uma diminuição em imunogenicidade em um indivíduo sensível de pelo menos cerca de 10%, preferivelmente pelo menos cerca de 25%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 40% e mais preferivelmente pelo menos cerca de 50%, com relação à imunogenicidade para este indivíduo do GH parental. O termo "proteção de protease" ou "protegido por protease" conforme aqui usado pretende indicar que o GH conjugado da presente invenção é mais resistente à peptidase ou

proteases no plasma do que é o GH parental. Enzimas protease e peptidase presentes em plasma são conhecidas estar envolvidas na degradação de proteínas em circulação, tal como, por exemplo, circulação de hormônios de peptídeo, tal como hormônio do crescimento. Tal proteção de protease pode ser medida através do método do Exemplo A descrito aqui.

[000290] Hormônio do crescimento pode ser suscetível à degradação por, por exemplo, serina proteinase tipo trombina, plasmina, subtilisina e quimiotripsina. Ensaio para determinação de degradação dessas proteases são descritos em *J. Biotech.*, **65**, 183, (1998). Em uma modalidade, a taxa de hidrólise do conjugado de GH é menos do que 70%, tal como menos do que 40%, tal como menos do que 10%, daquela do GH parental.

[000291] O componente de proteína mais abundante em circulação de sangue de espécies de mamífero é albumina do soro, que está normalmente presente em uma concentração de aproximadamente 3 a 4,5 gramas por 100 mililitros de sangue integral. Albumina do soro é uma proteína sanguínea de aproximadamente 65.000 daltons que tem várias funções importantes no sistema circulatório. Ela funciona como um transportador de uma variedade de moléculas orgânicas encontradas no sangue, como o transportador principal de vários metabólitos tais como ácido graxo e bilirrubina no sangue e, devido à sua abundância, como um regulador osmótico do sangue em circulação. Albumina do soro tem uma meia-vida de mais de uma semana, e uma abordagem para aumentar a meia-vida no plasma de proteínas tem sido conjugar à proteína um grupo que se liga à albumina do soro. A propriedade de ligação à albumina pode ser determinada conforme descrito em *J. Med. Chem.*, **43**, 1986, (2000), que é aqui incorporado a título de referência.

[000292] Os conjugados de hormônio do crescimento de fórmula (I)

ou (II) exercem atividade de hormônio do crescimento e podem então ser usados no tratamento de doenças ou estados que se beneficiarão de um aumento na quantidade de hormônio do crescimento em circulação. Em particular, a invenção provê um método para o tratamento de deficiência de hormônio do crescimento (GHD) (*Growth Hormone Deficiency*); Síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS) (*Prader-Willi syndrome*); síndrome de Noonan; síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatoide juvenil; fibrose cística; infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas nascidas baixas para a idade gestacional (SGA) (*Short for Gestational Age*); estatura baixa em crianças nascidas com peso para o nascimento muito baixo (VLBW) (*Very Low Birth Weight*) exceto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS) (*Idiopathic Short Stature*); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tais como tíbia, fíbula, fêmur, →, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso e dedo; fraturas em ou de ossos esponjosos, tais como o crânio, base da mão e base do pé; pacientes após cirurgia do tendão ou ligamento em, por exemplo, mão, joelho ou ombro; pacientes tendo ou sofrendo de osteogênese por distração; pacientes após substituição do quadril ou disco, reparo do menisco, fusões espinhais ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, cotovelo, pulso ou maxilar; pacientes em que material de osteossíntese, tais como unhas, parafusos e placas, foi fixado; pacientes com não união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo, da tíbia ou 1º dedo; pacientes após implante de enxerto; degeneração da cartilagem articular em joelho causada por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular associada à má nutrição em APCD; reversão de caquexia em APCD;

câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idoso com APCD; doença hepática crônica em APCD, síndrome da fadiga em APDC; doença de Chron; função hepática prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome do intestino curto; obesidade central; síndrome da lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva grande, desintoxicação de álcool/droga ou trauma neurológico; envelhecimento; idoso fraco; osteoartrite; cartilagem traumáticamente lesionada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; lesão cerebral traumática; hemorragia subaracnóide; peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; ou estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças, o método compreendendo administrar a um paciente com necessidade do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um conjugado de hormônio do crescimento de acordo com a fórmula (I) ou (II).

[000293] Em um aspecto adicional, a invenção provê um método para aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; a aceleração ou melhora de fluxo sanguíneo para tecido lesionado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido lesionado, o método compreendendo administrar a um paciente com necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II).

[000294] Em uma modalidade adicional, a invenção se refere ao uso de um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) na fabricação de doenças que se beneficiam de um aumento no nível de plasma de hormônio do crescimento, tal como a doença mencionada acima.

[000295] Uma dose parenteral típica está na faixa de  $10^{-9}$  mg/kg a

cerca de 100 mg/kg de peso do corpo por administração. Doses de administração típicas são de a partir de cerca de 0,0000001 a cerca de 10 mg/kg de peso do corpo por administração. A dose exata vai depender de, por exemplo, indicação, medicamento, frequência e modo de administração, do sexo, idade e condição geral do indivíduo a ser tratado, a natureza e a severidade da doença ou condição a ser tratada, o efeito desejado do tratamento e outros fatores evidentes à pessoa versada na técnica.

[000296] Frequências de dosagem típicas são duas vezes por dia, uma vez por dia, duas vezes por semana, uma vez por semana ou intervalos de dosagem ainda mais longos. Devido às meias-vidas prolongadas das proteínas de fusão da presente invenção, um regime de dosagem com intervalos de dosagem longos, tal como duas vezes por semana, uma vez por semana ou com intervalos de dosagem mais longos, é uma modalidade particular da invenção.

[000297] Muitas doenças são tratadas usando mais de um medicamento no tratamento, ou concomitantemente administrado ou sequencialmente administrado. Está então dentro do escopo da presente invenção usar um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) em métodos terapêuticos para o tratamento de uma das doenças mencionadas acima em combinação com um ou mais outro(s) composto(s) terapeuticamente ativo(s) normalmente usados no tratamento das ditas doenças. Por analogia, está também dentro do escopo da presente invenção usar um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) em combinação com outros compostos terapeuticamente ativos normalmente usados no tratamento de uma das doenças mencionadas acima na fabricação de um medicamento para a dita doença.

#### Métodos gerais

#### Conjugação de enzima:

[000298] Na preparação de um conjugado de hormônio do crescimento da presente invenção, tipicamente pelo menos uma das ligações covalentes estabelecidas na preparação de um conjugado de A-W-B-GH de fórmula (I) é preparada através do uso de uma enzima conforme ilustrado nos exemplos abaixo. Tal enzima pode, por exemplo, ser selecionada do grupo consistindo em transglutaminases, serina proteases e cisteína proteases. Tipicamente, a dita enzima é transglutaminase. Tal transglutaminase pode, por exemplo, ser selecionada do grupo consistindo em transglutaminases microbianas, transglutaminases de tecido e fator XIII e suas variantes. Em outra modalidade, a dita enzima é uma cisteína protease. O conjugado de hormônio do crescimento da presente invenção pode ser preparado através de muitos métodos diferentes, exemplos não limitantes são mostrados abaixo.

[000299] A presente invenção também provê métodos para preparação de conjugados de A-W-B-GH de fórmula (I).

#### Transglutaminase

[000300] Conforme acima declarado, pelo menos uma das ligações covalentes estabelecidas na preparação de um conjugado de A-W-B-GH da presente invenção pode ser preparada através do uso de uma transglutaminase. Transglutaminases podem incluir transglutaminases microbianas tais como aquelas isoladas da espécie *Streptomyces*; *S. mobaraense*, *S. cinnamoneum*, *S. griseocarneum* (US5156956 incorporada aqui a título de referência), *S. lavendulae* (US5252469 incorporada aqui a título de referência) e *S. ladakanum* (JP2003/199569 incorporada aqui a título de referência). Outras transglutaminases microbianas úteis foram isoladas de *Bacillus subtilis* (reveladas na US5731183, que é aqui incorporada a título de referência) e de vários *Myxomycetes*. Outros exemplos de transglutaminases microbianas úteis são aqueles revelados no

WO1996/06931 (por exemplo, transglutaminase de *Bacillus lydicus*) e WO1996/22366, ambos aqui incorporados a título de referência. Transglutaminases não microbianas úteis incluem transglutaminase de fígado de porquinho-da-índia e transglutaminases de várias fontes marinhas tal como o peixe chato *Pagrus major* (revelado na EP 0555649, que é aqui incorporada a título de referência) e a ostra Japonesa *Crassostrea gigas* (revelada na US5736356, que é aqui incorporada a título de referência). Análogos e derivados funcionais dos mesmos podem ser também úteis.

[000301] Tipicamente, a TGase usada nos métodos da invenção é uma transglutaminase microbiana. Em uma modalidade, a TGase é de *S. mobaraense* ou uma variante da mesma, por exemplo, conforme descrito no WO2007/020290 e no WO2008/020075. Em outra modalidade, a TGase é de *S. ladakanum* ou uma variante da mesma, por exemplo, conforme descrito no WO2008/020075.

[000302] A conjugação de GH a A-W-B de acordo com a presente invenção pode ser obtida através da modificação mediada por TGase levando à alteração seletiva em posições de lisina (Lys) ou glutamina (Gln) na sequência do composto de GH dependendo do substrato usado. Uso de aminas como substratos vai levar à modificação de Glutaminas, enquanto o uso de amidas primárias vai levar à modificação de Lisinas. hGH (SEQ ID NO:1) tem 9 resíduos de lisina nas posições 38, 41, 70, 115, 140, 145, 158, 168 e 172 e 13 resíduos glutamina nas posições 22, 29, 40, 46, 49, 68, 69, 84, 91, 122, 137, 141 e 181, embora nem todos esses estejam prontamente disponíveis para modificação nem adequadamente para modificações uma vez que isso vai levar à potência de ligação menor à proteína de ligação ao hormônio do crescimento então levando à atividade biológica reduzida. A estrutura de cristal de proteína de raio x entre hGH e sua proteína de ligação (pdb: 3HHR) revela que pelo menos 4 lisinas (38, 41, 168 e

172) participam da ligação à proteína de ligação e potencialmente apenas uma das glutaminas (Gln 46). Isto torna as glutaminas mais atraentes como alvo para introdução seletiva de um ligante de ligação à albumina. Essas considerações estruturais são ainda apoiadas por constatações sumarizadas por N. Chêne e outros em *Reprod. Nutr. Develop.* **29**, 1-25 (1989) em que é concluído que modificações químicas afetando lisinas foram verificadas ter um efeito negativo sobre a atividade biológica *in vivo* e sobre a capacidade de ligação aos receptores de GH no fígado.

#### Química I

[000303] Em um aspecto a presente invenção se refere à preparação de um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) em que um composto de GH é tratado com um grupo de modificação de propriedade usando química catalisada por TGase. Inicialmente, uma funcionalidade aldeído ou cetona é instalada através de uma reação de duas etapas usando amino álcoois que são subsequentemente tratados com periodato para gerar uma funcionalidade aldeído ou ceto através de clivagem oxidativa. Exemplos não limitantes de amino álcoois para ilustração incluem apenas 1,3-diamino-2-propanol e 1-amino-2,3-di-hidroxipropano.

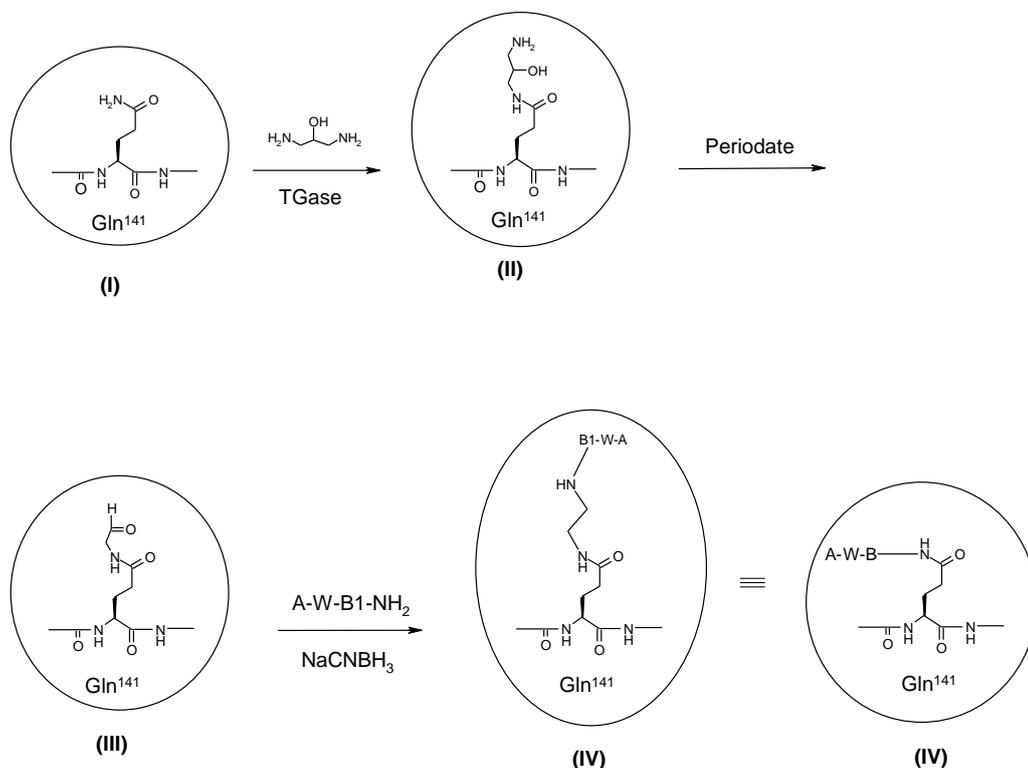
[000304] Em um aspecto adicional a presente invenção se refere à preparação de um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) compreendendo tratamento de um aldeído ou cetona derivado do composto de GH com uma anilina ou heteroaril amina derivada de grupo de modificação de propriedade para dar uma amina (III → IV).

[000305] Em uma modalidade, aldeído derivado do composto de GH é tratado com anilina ou heteroarilamina derivada de grupo de modificação de propriedade.

[000306] O termo "aldeído (ou cetona) derivado de composto de GH" ou "um aldeído ou cetona derivado do composto de GH" pretende

indicar um composto de GH ao qual um grupo funcional aldeído ou cetona foi covalentemente ligado ou um composto no qual um grupo funcional aldeído ou cetona foi gerado. A preparação de aldeídos derivados de composto de GH, tai como composto (III) ilustrado abaixo, é bem conhecida daqueles de habilidade na técnica, e qualquer um desses procedimentos conhecidos pode ser usado para preparar o aldeído derivado de composto de GH (III) requerido para a realização da invenção revelada aqui.

[000307] Em uma modalidade, o conjugado A-W-B-GH (IV) é preparado conforme ilustrado abaixo:

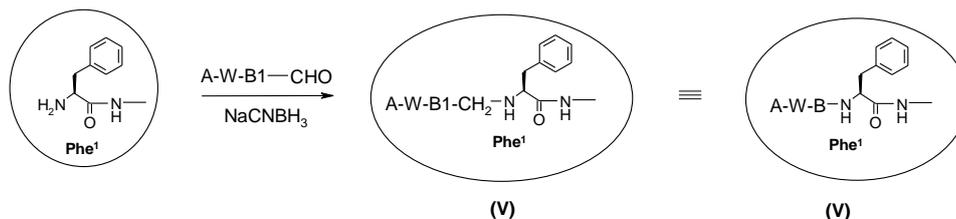


[000308] A reação enzimática mediada por TGase com GH (I) resulta na modificação de Gln na posição 141 e/ou 40 fornecendo (II). O GH modificado (II) é tratado com periodato para clivar o amino álcool para prover um aldeído derivado de GH (III). Conjugação de aldeído de GH (III) com A-W-B1-NH<sub>2</sub> ocorre com através de alquilação redutiva (III→IV). Alquilação redutiva conforme exemplificado aqui é bem reconhecida na técnica e resulta em compostos de GH (IV)

modificados em posição Gln(141) e/ou 40.

### Química II

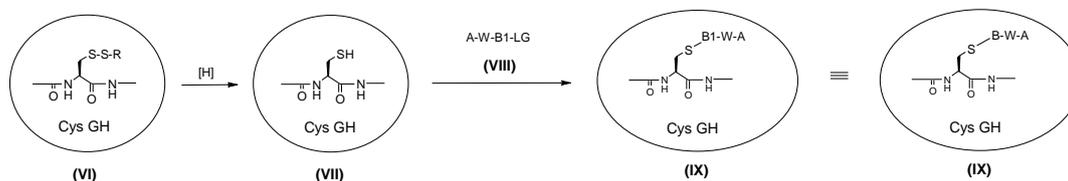
[000309] Em uma modalidade, o conjugado A-W-B-GH é preparado usando aminação redutiva em terminal N de GH conforme ilustrado abaixo:



[000310] Conjugação de GH a A-W-B1-CHO ocorre através de alquilação redutiva (GH → V). Alquilação redutiva conforme acima exemplificado é bem reconhecida na técnica para modificação do terminal N de GH.

### Química III

[000311] Em uma modalidade, o conjugado A-W-B-GH é preparado conforme ilustrado abaixo:

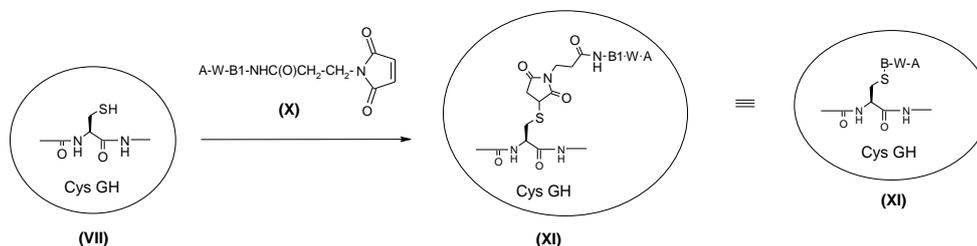


[000312] Onde o resíduo cisteína é opcionalmente protegido como um dissulfeto misto (VI) (GH-S-S-R) com R sendo uma porção orgânica pequena. Exemplos não limitantes de dissulfetos mistos podem incluir dissulfetos entre cistamina (R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); cisteína (R = -CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>); homocisteína (R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>); e glutathiona (R = -CH<sub>2</sub>CH(C(O)NH-CH<sub>2</sub>C(O)OH)NH-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>).

[000313] O processo de derivatização utiliza um ligante de ligação à albumina A-W-B1-LG em que LG representa um grupo de saída inorgânico tal como -Cl, -Br ou -I ou um grupo de saída orgânico tal como mesilato ou tosilato. Conjugação de GH com A-W-B1-LG ocorre

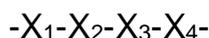
através de substituição nucleofílica (**VII** → **IX**).

#### Química IV



[000314] Composto de GH Cys desprotegida (**VII**) conforme obtido a partir de (**VI**) acima pode ser reagido com um ligante de ligação à albumina substituído com maleimida (**X**) fornecendo conjugado de GH A-W-B1-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-pirrolidin-2,5-diona-3-GH (**XI**).

em que o espaçador hidrofílico B1 tem a fórmula



em que

$X_1$  é  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$

$X_2$  é  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$

$X_3$  é  $-[(CHR^5)_{I5}]_{m7}-$

$X_4$  é uma ligação de valência,

$I1, I2, I3, I4$  e  $I5$  são independentemente selecionados de 0-

16,

$m1, m3, m4, m6$  e  $m7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m2$  e  $m5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n1, n2, n3$  e  $n4$  são independentemente selecionados de 0-

16,

$R^1, R^2, R^3, R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  ou  $-OH$ ,

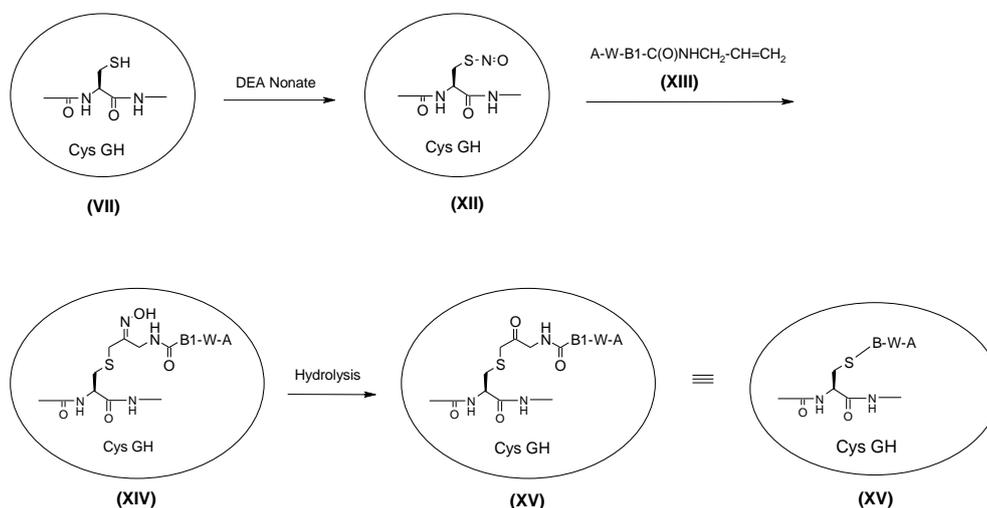
[000315]  $E1$  e  $E2$  são independentemente selecionados de  $-O-$ ,  $-$

NR<sup>6</sup>-, -N(COR<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s2 é 0 ou 1.

### Química V

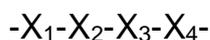
[000316] Em uma modalidade, o conjugado A-W-B-GH é preparado conforme ilustrado abaixo:



[000317] Ligantes de albumina podem ser ligados a derivados de GH de cys única usando química S-nitrosila conforme descrito no WO2009/024791.

[000318] Composto de GH de Cys desprotegida (VII) é submetido à S-nitrosilação através da adição de um doador de NO tal como DEA Nonate (Sigma Aldrich). GH de cys única nitrosilado (XII) é então reagido com um ligante de albumina substituído com alil amina (XIII) fornecendo oxima (XIV) que após hidrólise fornece conjugado de GH A-W-B1-C(O)NHCH<sub>2</sub>C(O)CH<sub>2</sub>-Cys GH (XV).

em que o espaçador hidrofílico B1 tem a fórmula



em que

$X_1$  é  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ,

$X_2$  é  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ,

$X_3$  é  $-[(CHR^5)_{I5}]_{m7}-$ ,

$X_4$  é uma ligação de valência,

$I1, I2, I3, I4$  e  $I5$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m1, m3, m4, m6$  e  $m7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m2$  e  $m5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n1, n2, n3$  e  $n4$  são independentemente selecionados de 0-16,

$R^1, R^2, R^3, R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  ou  $-OH$ ,  $E1$  e  $E2$  são independentemente selecionados de  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  ou uma ligação de valência; em que  $R^6$  e  $R^7$  representam independentemente hidrogênio ou  $C_{1-6}$ -alquila,

$W_1$  a  $W_5$  são independentemente selecionados de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s2$  é 0 ou 1.

[000319] Uma relação próxima com o peptídeo natural é geralmente considerada como uma vantagem com intervenções terapêuticas compreendendo administração de variantes ou análogos deste peptídeo natural uma vez que ela minimiza o risco de, por exemplo, qualquer geração de anticorpo indesejada.

[000320] GH pode ser modificado em seu terminal C através do uso

de carboxipeptidase Y (EC. 3.4.16.5) e substratos modificados adequados conforme descrito no WO2007/093594. Um procedimento de duas etapas conforme descrito por B. Peschke e outros "C-Terminally PEGylated GH derivatives" *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4382-4395, (2007), em que a alanina do terminal C é enzimaticamente modificada com N<sup>ε</sup>-(4-acetilbenzoi)lisina, seguido por reação com derivados de ligação à albumina de acordo com a invenção.

[000321] Como aparente a partir do acima a invenção se refere ainda ao ligante intermediário aplicado na preparação do conjugado A-W-B-GH. O dito composto ligante pode ser descrito na fórmula (III)



em que A representa um resíduo de ligação à albumina,

B1 representa um espaçador hidrofílico,

W é um grupo químico ligando A e B1 e U representa uma porção de conjugação.

[000322] Com base no acima a porção de conjugação vai variar dependendo do método de conjugação aplicado que pode no final ser também visível no composto de hGH final (A,W,B,GH).

[000323] Em modalidades adicionais do composto, A-W-B1-U, A e W são conforme definido em qualquer uma das modalidades acima.

[000324] Quando o método descrito acima como Química IV é aplicado, o composto A-W-B1-U pode ser definido adicionalmente, como uma modalidade, em que U compreende ou consiste em uma arila, uma hetarila, uma malimida substituída ou uma pirrolidino-2,5-diona tal como -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-pirrolidin-2.5-diona.

[000325] Em modalidades alternativas do composto A-W-B1-U, U compreende D1-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-D2, em que D1 e D2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R6)-, -NC(O)R7- ou uma ligação de valência; em que R6 e R7 representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>alquila.

[000326] Da mesma maneira aplicação de Química III conforme descrito acima vai aplicar compostos ligantes em que U compreende ou consiste em um grupo de saída, tal como Cl, Br, I, -OH, -OS(O)<sub>2</sub>Me, -OS(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> ou -OTs, ou preferivelmente compostos de acordo com a fórmula (III), em que o grupo de saída é um composto halogênio selecionado de Cl, Br e I, preferivelmente Br.

[000327] Modalidades adicionais dos compostos ligantes (que são aplicados em Química V) são de acordo com a invenção definidas pela fórmula (III), em que U compreende ou consiste em uma alil amina (H<sub>2</sub>C=CH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), tal como -C(O)NHCH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>.

[000328] Quando o método descrito acima como Química I é aplicado, o composto A-W-B1-U pode ser definido mais, como uma modalidade, em que U compreende ou consiste em uma amina (-NH<sub>2</sub>).

[000329] Em modalidades alternativas, U pode compreender ou consistir em um aldeído, tal como -CHO.

[000330] Os compostos podem ser conjugados a qualquer tipo de composto terapêutico que inclua um grupo aceitador ao qual "U" pode permitir conjugação. Em uma modalidade preferida o composto terapêutico é um polipeptídeo. Peptídeos podem incluir naturalmente resíduos AA que podem funcionar como um grupo aceitador, tais como resíduos Gln, resíduos Phe e resíduos Cys. Alternativamente tais resíduos de aminoácido podem ser introduzidos em uma posição apropriada no polipeptídeo.

### COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[000331] Outro propósito é prover uma composição farmacêutica compreendendo um conjugado de hormônio do crescimento da presente invenção, tal como um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II), que está presente em uma concentração de a partir de 10-15 mg/mL a 200 mg/mL, tal como, por exemplo, 10-10 mg/mL a 5 mg/mL e em que a dita composição tem

um pH de a partir de 2,0 a 10,0. A composição pode compreender ainda excipientes farmacêuticos, tais como um sistema de tampão, preservativo(s), agente(s) de tonicidade, agente(s) de quelação, estabilizadores e tensoativos. Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica é uma composição aquosa, isto é, composição compreendendo água. Tal composição é tipicamente uma solução ou uma suspensão. Em uma modalidade adicional da invenção a composição farmacêutica é uma solução aquosa. O termo "composição aquosa" é definido como uma composição compreendendo pelo menos 50% p/p de água. Da mesma maneira, o termo "solução aquosa" é definido como uma solução compreendendo pelo menos 50% p/p de água e o termo "suspensão aquosa" é definido como uma suspensão compreendendo pelo menos 50% p/p de água.

[000332] Em outra modalidade a composição farmacêutica é uma composição seca por congelamento, à qual o médico ou paciente adiciona solventes e/ou diluentes antes do uso.

[000333] Em outra modalidade a composição farmacêutica é uma composição seca (por exemplo, seca por congelamento ou seca por pulverização) pronta para uso sem qualquer dissolução prévia.

[000334] Em um aspecto adicional a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma solução aquosa de um conjugado de hormônio do crescimento, tal como um conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II), e um tampão, em que o dito conjugado de GH está presente em uma concentração de a partir de 0,1-100 mg/mL ou acima, e em que a dita composição tem um pH de a partir de cerca de 2,0 a cerca de 10,0.

[000335] Em outra modalidade da invenção o pH da composição é selecionado da lista consistindo em 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 e 10.

[000336] Em uma modalidade adicional da invenção o tampão é selecionado do grupo consistindo em acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, di-hidrogeno fosfato de sódio, hidrogeno fosfato de sódio, fosfato de sódio e tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou misturas dos mesmos. Cada um desses tampões específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção.

[000337] Em uma modalidade adicional da invenção a composição compreende ainda um preservativo farmacologicamente aceitável. Em uma modalidade adicional da invenção o preservativo é selecionado do grupo consistindo em fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, álcool benzílico, clorobutanol e timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidoureira, clorexidina, desidroacetato de sódio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloreto de benzetônio, clorfenesina (3-(p-clorofenóxi)propano-1,2-diol) ou misturas dos mesmos. Em uma modalidade adicional da invenção o preservativo está presente em uma concentração de a partir de 0,1 mg/mL a 20 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o preservativo está presente em uma concentração de a partir de cerca de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o preservativo está presente em uma concentração de a partir de 5 mg/mL a 10 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o preservativo está presente em uma concentração de a partir de 10 mg/mL a 20 mg/mL. Cada um desses preservativos específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção. O uso de um

preservativo em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado na técnica. Por questão de conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> edição, 2000.

[000338] Em uma modalidade adicional da invenção a composição compreende ainda um agente isotônico. Em uma modalidade adicional da invenção o agente isotônico é selecionado do grupo consistindo em um sal (por exemplo, cloreto de sódio), um açúcar ou álcool de açúcar, um aminoácido (por exemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina), um alditol (por exemplo, glicerol(glicerina), 1,2-propanodiol (propilenoglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol (polietilenoglicol) (por exemplo, PEG 400) ou misturas dos mesmos. Qualquer açúcar tais como mono-, di- ou polissacarídeos, ou glicanos solúveis em água, incluindo, por exemplo, frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sacarose, trealose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietila e carboximetilcelulose-Na pode ser usado. Em uma modalidade o aditivo de açúcar é sacarose. Álcool de açúcar é definido como um hidrocarbono C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> tendo pelo menos um grupo – OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol e arabinol. Em uma modalidade o aditivo de álcool de açúcar é manitol. Os açúcares ou álcoois de açúcar mencionados acima podem ser usados individualmente ou em combinação. Não há nenhum limite fixado para a quantidade usada, contanto que o açúcar ou o álcool de açúcar seja solúvel na preparação líquida e não afete de modo adverso os efeitos de estabilização obtidos usando os métodos da invenção. Em uma modalidade, a concentração de açúcar ou álcool de açúcar está entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 150 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de a partir de 1 mg/mL a 50 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção ao agente isotônico está presente em

uma concentração de a partir de 1 mg/mL a 7 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de a partir de 8 mg/mL a 24 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o agente isotônico está presente em uma concentração de a partir de 25 mg/mL a 50 mg/mL. Cada um desses agentes isotônicos específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção. O uso de um agente isotônico em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado na técnica. Por questão de conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> edição, 2000.

[000339] Em uma modalidade adicional da invenção a composição compreende ainda um agente de quelação. Em uma modalidade adicional da invenção o agente de quelação é selecionado de sais de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico e ácido aspártico e misturas dos mesmos. Em uma modalidade adicional da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de a partir de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de a partir de 0,1 mg/mL a 2 mg/mL. Em uma modalidade adicional da invenção o agente de quelação está presente em uma concentração de a partir de 2 mg/mL a 5 mg/mL. Cada um desses agentes de quelação específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção. O uso de um agente de quelação em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado na técnica. Por questão de conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> edição, 2000.

[000340] Em uma modalidade adicional da invenção a composição compreende ainda um estabilizador. O uso de um estabilizador em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado na técnica. Por questão de conveniência referência é feita a Remington: *The*

*Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, 2000.

[000341] Mais particularmente, as composições da invenção são estabilizadas em composições farmacêuticas líquidas estabilizadas cujos componentes terapeuticamente ativos incluem uma proteína que possivelmente exibe formação de agregado durante armazenamento em composições farmacêuticas líquidas. Por "formação de agregado" quer dizer uma interação física entre as moléculas de proteína que resulta em formação de oligômeros, que podem permanecer solúveis, ou agregados visíveis grandes que precipitam da solução. Por "durante armazenamento" quer dizer uma composição farmacêutica líquida ou composição uma vez preparado que não é imediatamente administrada a um indivíduo. Pelo contrário, seguindo a preparação, ela é embalada para armazenamento, ou em uma forma líquida, um estado congelado ou em uma forma seca para reconstituição posterior em uma forma líquida ou outra forma adequada para administração a um indivíduo. Por "forma seca" quer dizer a composição farmacêutica líquida ou composição que é seca ou através de secagem por congelamento (isto é, liofilização; vide, por exemplo, Williams e Polli, *J. Parenteral Sci. Technol.*, **38**, 48-59, (1984)), secagem por pulverização (vide Masters (1991) em *Spray-Drying Handbook* (5ª edição; *Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.*), pp. 491-676; Broadhead e outros. *Drug Devel. Ind. Pharm.* **18**, 1169-1206, (1992); e Mumenthaler e outros, *Pharm. Res.*, **11**, 12-20, (1994)) ou secagem ao ar (Carpenter e Crowe, *Cryobiology* **25**, 459-470, (1988); e Roser, *Biopharm.* **4**, 47-53, (1991)). Formação de agregado por uma proteína durante armazenamento de uma composição farmacêutica líquida pode afetar de modo adverso a atividade biológica desta proteína, resultando em perda de eficácia terapêutica da composição farmacêutica. Ainda, formação de agregado pode causar outros problemas tais como bloqueio de tubulação, membranas ou bombas

quando a composição farmacêutica contendo proteína é administrada usando um sistema de infusão.

[000342] As composições farmacêuticas da invenção podem compreender ainda uma quantidade de uma base de aminoácido suficiente para diminuir formação de agregado pela proteína durante armazenamento da composição. Por "base de aminoácido" quer dizer um aminoácido ou uma combinação de aminoácidos, em que qualquer dado aminoácido está presente ou em sua forma de base livre ou em sua forma de sal. Onde uma combinação de aminoácidos fora usada, todos os aminoácidos podem estar presentes em suas formas de base livre, todos podem estar presentes em suas formas de sal ou alguns podem estar presentes em suas formas de base livre enquanto outros estão presentes em suas formas de sal. Em uma modalidade, aminoácidos para usar na preparação das composições da invenção são aqueles que carregam uma cadeia lateral carregada, tais como arginina, lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Qualquer estereoisômero (isto é, isômero L ou D ou misturas dos mesmos) de um aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina e misturas dos mesmos) ou combinações desses estereoisômeros ou glicina ou uma base orgânica tal como, mas não limitada a, imidazol, pode estar presente nas composições farmacêuticas da invenção contanto que o aminoácido ou base orgânica particular esteja presente ou em sua forma de base livre ou sua forma de sal. Em uma modalidade, o estereoisômero L de um aminoácido é usado. Em uma modalidade, o estereoisômero L é usado. As composições da invenção podem também ser formuladas com análogos desses aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" quer dizer um derivado do aminoácido de ocorrência natural que causa o efeito desejado de diminuição de formação de agregado pela proteína durante armazenamento das

composições farmacêuticas líquidas da invenção. Análogos de arginina adequados incluem, por exemplo, aminoguanidina, ornitina e N-monoetil L-arginina, análogos de metionina adequados incluem etionina e butionina e análogos de cisteína adequados incluem S-metil-L cisteína. Como com os outros aminoácidos, os análogos de aminoácido são incorporados às composições ou na forma de base livre ou em sua forma de sal. Em uma modalidade adicional da invenção os aminoácidos ou análogos de aminoácido são usados em uma concentração que é suficiente para prevenir ou retardar agregação da proteína.

[000343] Em uma modalidade adicional da invenção metionina (ou outros aminoácidos sulfúricos ou análogos de aminoácido) pode ser adicionada para inibir oxidação de resíduos de metionina para sulfóxido de metionina quando a proteína agindo como o agente terapêutico é uma proteína compreendendo pelo menos um resíduo de metionina suscetível a tal oxidação. Por "inibir" quer dizer acúmulo mínimo de espécie oxidada por metionina com o tempo. Inibição de oxidação metionina resulta em maior retenção da proteína em sua forma molecular apropriada. Qualquer estereoisômero de metionina (isômero L ou D) ou quaisquer combinações dos mesmos podem ser usados. A quantidade a ser adicionada deve ser uma quantidade suficiente para inibir oxidação dos resíduos metionina de maneira que a quantidade de sulfóxido de metionina seja aceitável pelas agências reguladoras. Tipicamente, isto significa que a composição não contém mais do que cerca de 10% a cerca de 30% de sulfóxido de metionina. Em geral isso pode ser obtido através da adição de metionina de maneira que a razão de metionina adicionada para resíduos de metionina varie de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1, tal como 10:1 a cerca de 100:1.

[000344] Em uma modalidade adicional da invenção a composição

compreende ainda um estabilizador selecionado do grupo de polímeros de peso molecular alto ou compostos moleculares baixos. Em uma modalidade adicional da invenção o estabilizador é selecionado de polietileno glicol (por exemplo, PEG 3350), álcool de polivinila (PVA), polivinilpirrolidona, carbóxi/hidroxicelulose ou derivados dos mesmos (por exemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L e HPMC), ciclodextrinas, substâncias contendo enxofre como monotioglicerol, ácido tioglicólico e 2-metiltioetanol e sais diferentes (por exemplo, cloreto de sódio). Cada um desses estabilizadores específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção.

[000345] As composições farmacêuticas podem também compreender agentes de estabilização adicionais, que aumentam mais a estabilidade de uma proteína terapeuticamente ativa nas mesmas. Agentes de estabilização de interesse particular para a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, metionina e EDTA, que protegem a proteína contra oxidação de metionina, e um tensoativo não iônico, que protege a proteína contra agregação associada com congelamento-descongelamento ou cisalhamento mecânico.

[000346] Em uma modalidade adicional da invenção a composição compreende ainda um tensoativo. Em uma modalidade adicional da invenção o tensoativo é selecionado de um detergente, óleo de rícino etoxilado, glicerídeos poliglicolizados, monoglicerídeos acetilados, ésteres do ácido graxo sorbitano, copolímeros em bloco de polioxipropileno-polioxietileno (por exemplo, poloxâmeros tal como Pluronic® F68, poloxâmero 188 e 407, Triton X-100), ésteres do ácido graxo polioxietileno sorbitano, derivados de polioxietileno e polietileno tais como derivados alquilados e alcoilados (tweens, por exemplo, Tween-20, Tween-40, Tween-80 e Brij-35), monoglicerídeos ou derivados etoxilados dos mesmos, diglicerídeos ou derivados de polioxietileno dos mesmos, álcoois, glicerol, lectinas e fosfolipídeos

(por exemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol e esfingomielina), derivados de fosfolipídeos (por exemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) e lisofosfolipídeos (por exemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina e ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina ou treonina) e derivados de alquila, alcoxila (alquil éster), alcóxi (alquil éter) de lisofosfatidil e fosfatidilcolinas, por exemplo, derivados de lauroíla e miristoíla de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina e modificações do grupo líder polar, isto é, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol e os DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP positivamente carregados, lisofosfatidilserina e lisofosfatidiltreonina e glicerofosfolipídeos (por exemplo, cefalinas), gliceroglicolipídeos (por exemplo, galactopiranosídeo), esfingoglicolipídeos (por exemplo, ceramidas, gangliosídeos), dodecilosfocolina, liolecitina de ovo de galinha, derivados do ácido fusídico (por exemplo, tauro-di-hidrofusidato de sódio, etc), ácidos graxos de cadeia longa e sais dos mesmos C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> (por exemplo, ácido oleico e ácido caprílico), acilcarnitinas e derivados, derivados N<sup>α</sup> acilados de lisina, arginina ou histidina, ou derivados acilados de cadeia lateral de lisina ou arginina, derivados N<sup>α</sup> acilados de dipeptídeos compreendendo qualquer combinação de lisina, arginina ou histidina e um aminoácido neutro ou ácido, derivados N<sup>α</sup> acilados de um tripeptídeo compreendendo qualquer combinação de um aminoácido neutro e dois aminoácidos carregados, DSS (docusato sódico, registro CAS No. [577-11-7]), docusato cálcico, registro CAS no. [128-49-4]), docusato de potássio, registro CAS no. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio), caprilato de sódio, ácido cólico ou derivados dos mesmos, ácidos de bile e sais dos mesmos e conjugados de glicina ou taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sódio, desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio, glicolato

de sódio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato, tensoativos monovalentes aniônicos (alquil-aril-sulfonatos), tensoativos zwitteriônicos (por exemplo, N-alquil-N,N-dimetilamônio-1-propanossulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamônio-1-propanossulfonato, tensoativos catiônicos (bases de amônio quaternário) (por exemplo, brometo de cetil-trimetilamônio, cloreto de cetilpiridínio), tensoativos não iônicos (por exemplo, dodecil  $\beta$ -D-glucopiranosídeo), poloxamidas (por exemplo, da Tetronic), que são copolímeros em bloco tetrafuncionais derivados da adição sequencial de óxido de propileno e óxido de etileno à etilenodiamina, ou o tensoativo pode ser selecionado do grupo de derivados de imidazolina, ou misturas dos mesmos. Cada um desses tensoativos específicos constitui uma modalidade alternativa da invenção.

[000347] O uso de um tensoativo em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado na técnica. Por questão de conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, 2000.

[000348] É possível que outros ingredientes possam estar presentes na composição farmacêutica da presente invenção. Tais ingredientes adicionais podem incluir agentes umectantes, emulsificantes, antioxidantes, agentes de volume, modificadores de tonicidade, agentes de quelação, íons de metal, veículos oleaginosos, proteínas (por exemplo, albumina do soro humano, gelatina ou proteínas) e um zwitteríon (por exemplo, um aminoácido tais como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tais ingredientes adicionais, com certeza, não devem afetar de modo adverso a estabilidade geral da composição farmacêutica da presente invenção.

[000349] As composições farmacêuticas contendo um conjugado de hormônio do crescimento de acordo com a presente invenção podem ser administradas a um paciente com necessidade de tal tratamento

em vários sítios, por exemplo, em sítios tópicos, por exemplo, sítios da pele e mucosais, em sítios que ultrapassam absorção, por exemplo, administração em uma artéria, em uma veia, no coração e em sítios que envolvem absorção, por exemplo, administração na pele, sob a pele, em um músculo ou no abdômen.

[000350] Administração de composições farmacêuticas de acordo com a invenção pode ser através de várias vias de administração, por exemplo, lingual, sublingual, bucal, na boca, oral, no estômago e intestino, nasal, pulmonar, por exemplo, através dos bronquíolos e alvéolos ou uma combinação dos mesmos, epidermal, dermal, transdermal, vaginal, retal, ocular, por exemplo, através da conjuntiva, uretal e parenteral a pacientes com necessidade de tal tratamento.

[000351] As composições da presente invenção podem ser administradas em várias formas de dosagem, por exemplo, como soluções, suspensões, emulsões, microemulsões, emulsão múltipla, espumas, pomadas, pastas, emplastros, unguentos, comprimidos, comprimidos revestidos, enxaguadores, cápsulas, por exemplo, cápsulas de gelatina dura e cápsulas de gelatina mole, supositórios, cápsulas retais, gotas, géis, *sprays*, pós, aerossóis, inalantes, colírios, unguentos oftálmicos, enxaguadores oftálmicos, pessários vaginais, anéis vaginais, unguentos vaginais, solução de injeção, soluções de transformação *in situ*, por exemplo, geleificação *in situ*, sedimentação *in situ*, precipitação *in situ*, cristalização *in situ*, solução de infusão e implantes.

[000352] As composições da invenção podem ser ainda compostas em, ou ligadas a, por exemplo, através de interações covalentes, hidrofóbicas e eletrostáticas, um carreador de fármaco, sistema de aplicação de fármaco e um sistema de aplicação de fármaco avançado a fim de aumentar mais a estabilidade do conjugado de hormônio do crescimento, aumentar a bioestabilidade, aumentar a solubilidade,

diminuir efeitos adversos, obter cronoterapia bem conhecida daqueles versados na técnica, e aumentar a obediência do paciente ou qualquer combinações dos mesmos. Exemplos de carreadores, sistemas de aplicação de fármaco e sistemas de aplicação de fármaco avançados incluem, mas não estão limitados a, polímeros, por exemplo, celulose e derivados, polissacarídeos, por exemplo, dextrano e derivados, amido e derivados, álcool de (poli)vinila, polímeros de acrilato e metacrilato, ácidos polilático e poliglicólico e copolímeros em bloco dos mesmos, polietileno glicóis, proteínas carreadoras, por exemplo, albumina, géis, por exemplo, sistemas de termogeleificação, por exemplo, sistemas copoliméricos em bloco bem conhecidos dos versados na técnica, micelas, lipossomas, microesferas, nanopartículas, cristais líquidos e suas dispersões, fase L2 e suas dispersões, bem conhecidos daqueles versados na técnica de comportamento de fase em sistemas de lipídeo-água, micelas poliméricas, emulsões múltiplas, autoemulsificantes, automicroemulsificantes, ciclodextrinas e derivados dos mesmos e dendrímeros.

[000353] As composições da presente invenção são úteis nas composições de sólidos, semissólidos, pó e soluções para administração pulmonar de conjugado de hormônio do crescimento usando, por exemplo, um inalador de dose medida, inalador de pó seco e um nebulizador, todos sendo dispositivos bem conhecidos daqueles versados na técnica.

[000354] As composições da presente invenção são especificamente úteis na composição de sistemas de aplicação de fármaco de liberação controlada, sustentada, prolongada, retardada e/ou lenta. Mais especificamente, mas não limitado, as composições são úteis em sistemas de liberação controlada parental e liberação sustentada (ambos os sistemas levando à redução de muitas vezes no número de

administrações), bem conhecidos daqueles versados na técnica. Com mais preferência ainda, os sistemas de liberação controlada e liberação sustentada são administrados subcutaneamente. Sem limitar o escopo da invenção, exemplos de sistema de liberação controlada e composições úteis são hidrogéis, géis oleaginosos, cristais líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

[000355] Métodos para produzir sistemas de liberação controlada úteis para composições da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, cristalização, condensação, cocrystalização, precipitação, coprecipitação, emulsificação, dispersão, homogeneização de alta pressão, encapsulação, secagem com pulverização, microencapsulação, coacervação, separação de fase, evaporação de solvente para produzir microesferas, extrusão e processos de fluido supercrítico. Referência geral é feita a *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release* (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) e *Drug and the Pharmaceutical Sciences* vol. **99**: *Protein Composition and Delivery* (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

[000356] Administração parental pode ser realizada através de injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente uma seringa tipo caneta. Alternativamente, administração parenteral pode ser realizada por meio de uma bomba de infusão. Uma opção adicional é uma composição que pode ser uma solução ou suspensão para a administração de conjugado de hormônio do crescimento na forma de um *spray* nasal ou pulmonar. Como uma opção adicional, as composições farmacêuticas contendo o conjugado de hormônio do crescimento da invenção podem ser também adaptadas para administração transdermal, por exemplo, através de injeção sem agulha ou a partir de um emplastro, opcionalmente um emplastro iontoforético, ou administração transmucosal, por exemplo, bucal.

[000357] O termo "composição estabilizada" se refere a uma composição com estabilidade física aumentada, estabilidade química aumentada ou estabilidades física e química aumentadas.

[000358] O termo "estabilidade física" da composição de proteína conforme aqui usado se refere à tendência da proteína em formar agregados biologicamente inativos e/ou insolúveis da proteína como um resultado de exposição da proteína a estresses termomecânicos e/ou interação com interfaces e superfícies que são desestabilizadores, tais como superfícies e interfaces hidrofóbicas. A estabilidade física das composições de proteína aquosas é avaliada por meio de inspeção visual e/ou medições de turbidez após exposição da composição cheia em recipientes adequados (por exemplo, cartuchos ou frascos) a estresse mecânico/físico (por exemplo, agitação) em temperaturas diferentes por vários períodos de tempo. Inspeção visual das composições é realizada em uma luz focada forte com uma base escura. A turbidez da composição é caracterizada por um *score* visual classificando o grau de turbidez, por exemplo, em uma escala de 0 a 3 (uma composição não mostrando nenhuma turbidez corresponde a um *score* visual 0 e uma composição mostrando turbidez visual à luz do dia corresponde a um *score* visual de 3). Uma composição é classificada física instável com relação à agregação de proteína quando ela mostra turbidez visual à luz do dia. Alternativamente, a turbidez da composição pode ser avaliada através de medições de turbidez simples bem conhecidas do versado na técnica. Estabilidade física das composições de proteína aquosas pode também ser avaliada usando um agente ou sonda espectroscópica do estado conformacional da proteína. A sonda é preferivelmente uma molécula pequena que se liga preferivelmente a um conformador não nativo da proteína. Um exemplo de uma sonda espectroscópica molecular pequena de estrutura de proteína é

Thioflavin T. Thioflavin T é um corante fluorescente que tem sido amplamente usado para a detecção de fibrilas amiloides. Na presença de fibrilas, e talvez outras configurações de proteína também, Thioflavin T dá origem a um novo máximo de excitação em cerca de 450 nm e emissão aumentada em cerca de 482 nm quando ligado a uma forma de proteína fibrilar. Thioflavin T não ligado é essencialmente não fluorescente nos comprimentos de onda.

[000359] Outras moléculas pequenas podem ser usadas como sondas das mudanças em estrutura de proteína de estados nativos para não nativos. Por exemplo, as sondas de "emplastro hidrofóbico" que se ligam preferivelmente a emplastos hidrofóbicos expostos de uma proteína. Os emplastos hidrofóbicos são geralmente postos dentro da estrutura terciária de uma proteína em seu estado nativo, mas ficam expostos conforme uma proteína começa a desdobrar ou desnaturar. Exemplos dessas sondas espectroscópicas, moleculares pequenas, são corantes hidrofóbicos, aromáticos, tal como antraceno, acridina, fenantrolina ou similar. Outras sondas espectroscópicas são complexos de metal-aminoácido, tais como complexos de cobalto metal de aminoácidos hidrofóbicos, tais como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina e valina ou similar.

[000360] O termo "estabilidade química" da composição de proteína conforme aqui usado se refere a mudanças químicas covalentes na estrutura da proteína levando à formação de produtos de degradação química com menos potência biológica potencial e/ou propriedades imunogênicas aumentadas potenciais comparado com a estrutura de proteína nativa. Vários produtos de degradação química podem ser formados dependendo do tipo e da natureza da proteína nativa e do ambiente ao qual a proteína é exposta. Eliminação de degradação química pode mais provavelmente não ser completamente evitada e quantidades grandes de produtos de degradação química são

frequentemente vistas durante armazenamento e uso da composição de proteína como bem conhecido do versado na técnica. A maior parte das proteínas é propensa à desaminação, um processo em que o grupo amida de cadeia lateral em resíduos glutaminila ou asparaginila é hidrolisado para formar um ácido carboxílico livre. Outros cursos de degradação envolvem formação de produtos de transformação de peso molecular alto em que duas ou mais moléculas de proteína são covalentemente ligadas umas às outras através de transaminação e/ou interações dissulfeto levando à formação de produtos de degradação de dímero, oligômero e polímero covalentemente ligados (*Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992*). Oxidação (de, por exemplo, resíduos metionina) pode ser mencionada como outra variante de degradação química. A estabilidade química da composição de proteína pode ser avaliada medindo a quantidade dos produtos de degradação química em vários pontos de tempo após exposição a condições ambientais diferentes (a formação de produtos de degradação pode ser frequentemente acelerada através de, por exemplo, aumento da temperatura). A quantidade de cada produto de degradação individual é frequentemente determinada através da separação dos produtos de degradação dependendo do tamanho molecular e/ou carga usando várias técnicas de cromatografia (por exemplo, SEC-HPLC e/ou RP/HPLC).

[000361] Desta maneira, conforme acima mostrado, uma "composição estabilizada" se refere a uma composição com estabilidade física aumentada, estabilidade química aumentada ou estabilidades física e química aumentadas. Em geral, uma composição deve ser estável durante uso e armazenamento (em obediência às condições de uso e armazenamento recomendadas) até a data de validade.

[000362] Em uma modalidade da invenção a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) é estável por mais de 6 semanas de uso e por mais de 3 anos de armazenamento.

[000363] Em outra modalidade da invenção a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) é estável por mais de 4 semanas de uso e por não mais do que 3 anos de armazenamento.

[000364] Em uma modalidade adicional da invenção a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) é estável por mais de 4 semanas de uso e por mais do que dois anos de armazenamento.

[000365] Em uma modalidade adicional da invenção a composição farmacêutica compreendendo o conjugado de hormônio do crescimento de fórmula (I) ou (II) é estável por mais de 2 semanas de uso e por mais de dois anos de armazenamento.

[000366] Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente e patentes, mencionadas aqui são incorporadas a título de referência até o mesmo ponto que se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada estar incorporada a título de referência e fosse mostrada em sua totalidade aqui.

Todos os cabeçalhos e subcabeçalhos são usados aqui por questão de conveniência apenas e não devem ser considerados como limitantes da invenção de modo algum.

[000367] Qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas as suas variações possíveis é compreendida pela invenção a menos que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto.

[000368] Os termos "um" e "uma" e "o, a" e referentes similares conforme usado no contexto de descrição da invenção devem ser

considerados compreender ambos o singular e o plural (isto é, um ou mais), a menos que de outro modo indicado ou claramente contradito pelo contexto.

[000369] Menção de faixas de valores aqui pretende apenas servir como um método de abreviação de referência individualmente a cada valor separado dentro da faixa, a menos que de outro modo indicado aqui, e cada valor separado é incorporado ao relatório como se ele fosse individualmente mencionado aqui. A menos que de outro modo declarado, todos os valores exatos providos aqui são representativos de valores aproximados correspondentes (por exemplo, todos os valores exemplares exatos providos com relação a um fator particular ou medição podem ser considerados também prover uma medição aproximada correspondente, modificada por "cerca de", em que apropriado).

[000370] Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem adequada a menos que de outro modo indicado aqui ou então claramente contradito pelo contexto.

[000371] O uso de qualquer um e todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, "tal como") provida aqui, pretende apenas esclarecer melhor a invenção e não impor uma limitação ao escopo da invenção a menos que de outro modo indicado. Nenhuma linguagem no relatório deve ser considerada como indicando qualquer elemento sendo necessário para a prática da invenção a menos que muito seja explicitamente declarado.

[000372] A citação e a incorporação de documentos de patente aqui são feitas por questão de conveniência apenas e não refletem nenhuma visão da validade, patenteabilidade e/ou exigibilidade de tais documentos de patente.

[000373] Uma lista não exaustiva de modalidade descrevendo a invenção é provida abaixo.

Lista de modalidades

[000374] Modalidade 1: Um conjugado de hormônio do crescimento que compreende um composto de hormônio do crescimento (GH) tendo

- a) uma mutação de Cys única,
- b) uma ponte dissulfeto adicional, ou
- c) uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto

adicional,

em que um resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado ao dito GH, ou

um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[000375] 2. O conjugado da modalidade 1, em que GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1), tal como pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95%, de identidade com hGH ou GH é hGH (SEQ ID NO:1).

[000376] 3. O conjugado da modalidade 1, em que GH ou o conjugado de GH tem pelo menos 80% da atividade de hormônio do crescimento de hGH.

[000377] 4. O conjugado de acordo com qualquer uma das modalidades 1-3, em que o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado a um GH tendo uma mutação de Cys única.

[000378] 5. O conjugado da modalidade 4, em que a mutação de Cys única é posicionada em qualquer uma das regiões selecionadas do terminal N, H1, H2, L2 ou H3 de GH.

[000379] 6. O conjugado da modalidade 5, em que o GH tem uma mutação de Cys única selecionada de qualquer uma de T3C, P5C,

S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C.

[000380] 7. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-3, em que o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado a um GH tendo uma ponte dissulfeto adicional.

[000381] 8. O conjugado da modalidade 7, em que a ligação dissulfeto adicional é entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro do segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[000382] 9. Conjugado de qualquer uma das reivindicações 7-8, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tais como resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

[000383] 10. O conjugado de qualquer uma das modalidades 7-9, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça com um segmento de hélice, tal como hélice B ou H2.

[000384] 11. O conjugado de qualquer uma das modalidades 7-10, em que a ligação dissulfeto adicional conecta L3 com H2.

[000385] 12. Conjugado de qualquer uma das modalidades 7-11, em que a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

[000386] 13. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-3, em que o resíduo de ligação à albumina através de um espaçador hidrofílico é ligado a um GH tendo uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional.

[000387] 14. O conjugado da modalidade 13, em que o GH tem uma mutação de Cys única selecionada de qualquer uma 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 e G126C.

[000388] 15. O conjugado de qualquer uma das modalidades 13-14, em que a ligação dissulfeto adicional é entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro de segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

[000389] 16. O conjugado de qualquer uma das modalidades 13-15, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

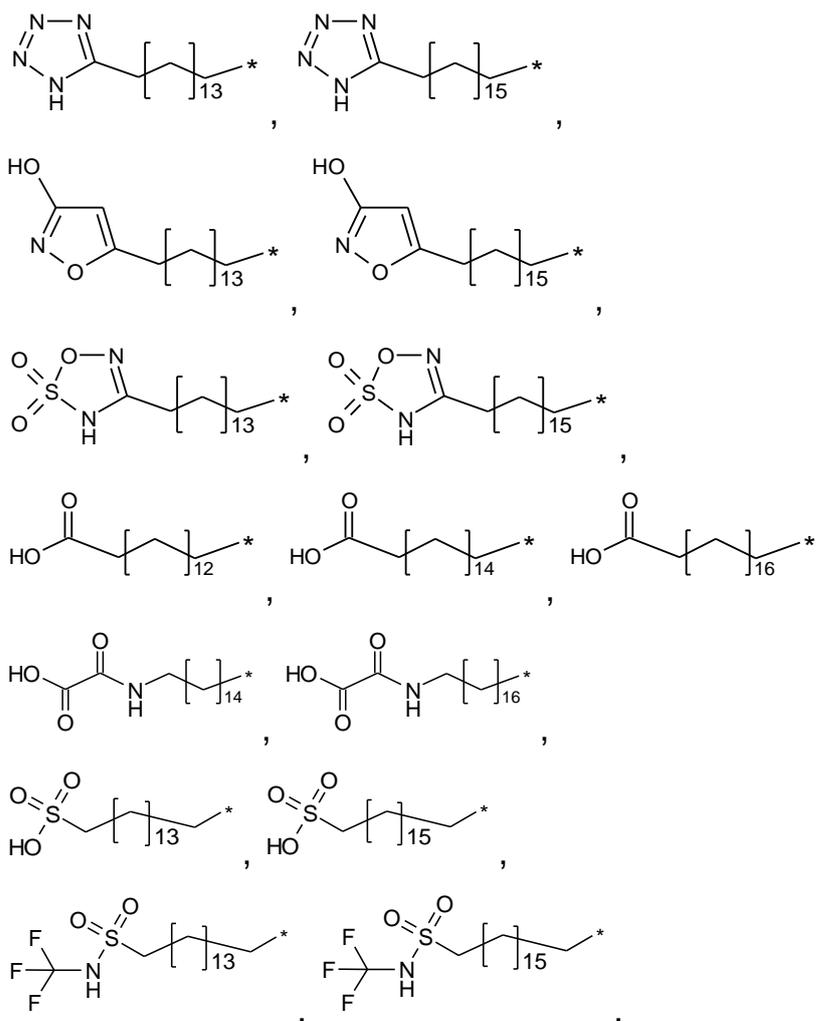
[000390] 17. O conjugado de qualquer uma das modalidades 13-16, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, com um segmento de hélice, tal como hélice B ou H2.

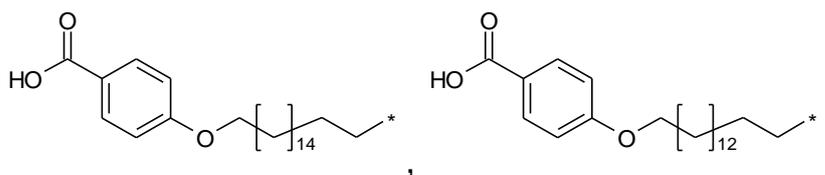
[000391] 18. Conjugado de qualquer uma das modalidades 13-17, em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3), com hélice B ou H2.

[000392] 19. O conjugado de qualquer uma das modalidades 13-18, em que a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

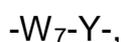
[000393] 20. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-19, em que o resíduo de ligação à albumina é selecionado de





em que \* indica a ligação ao espaçador hidrofílico através de um grupo químico ligando o resíduo de ligação à albumina e o espaçador hidrofílico.

[000394] 21. Conjugado de qualquer uma das modalidades 1-20, em que o grupo químico ligando o resíduo de ligação à albumina e o espaçador hidrofílico tem a fórmula



em que

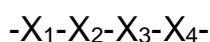
Y é  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquila- $W_8-$  ou uma ligação de valência,

$17$  é 0-6,

$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s3$  é 0 ou 1,

$W_8$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência, em que  $s4$  é 0 ou 1.

[000395] 22. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-21, em que o espaçador hidrofílico tem a fórmula



em que

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

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

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

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ ,

I1, I2, I3, I4, I5 e I6 são independentemente selecionados de 0-16,

m1, m3, m4, m6 e m7 são independentemente selecionados de 0-10,

m2 e m5 são independentemente selecionados de 0-25,

n1, n2, n3 e n4 são independentemente selecionados de 0-16,

F é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência, em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

D1, D2, E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

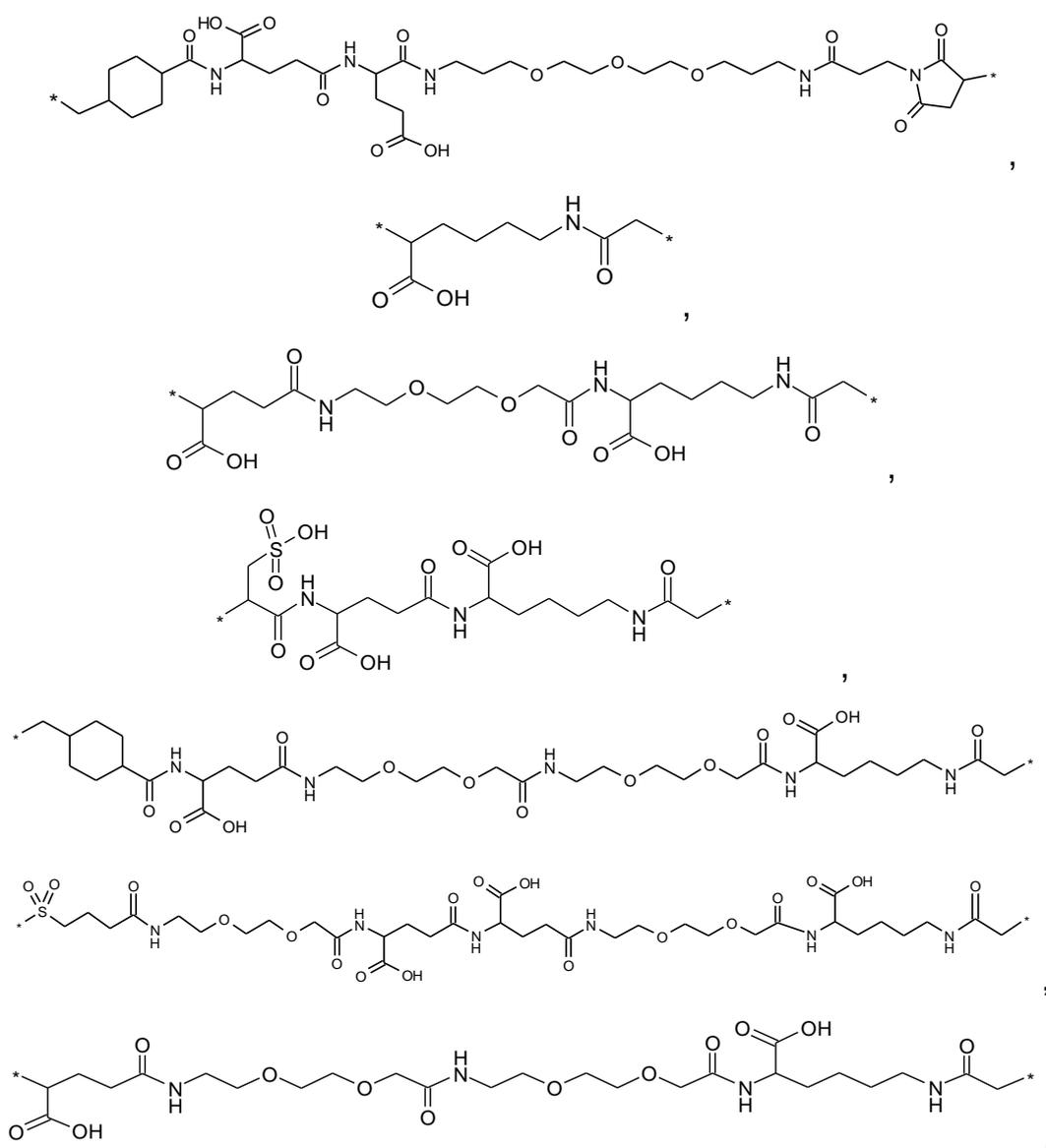
W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s2 é 0 ou 1,

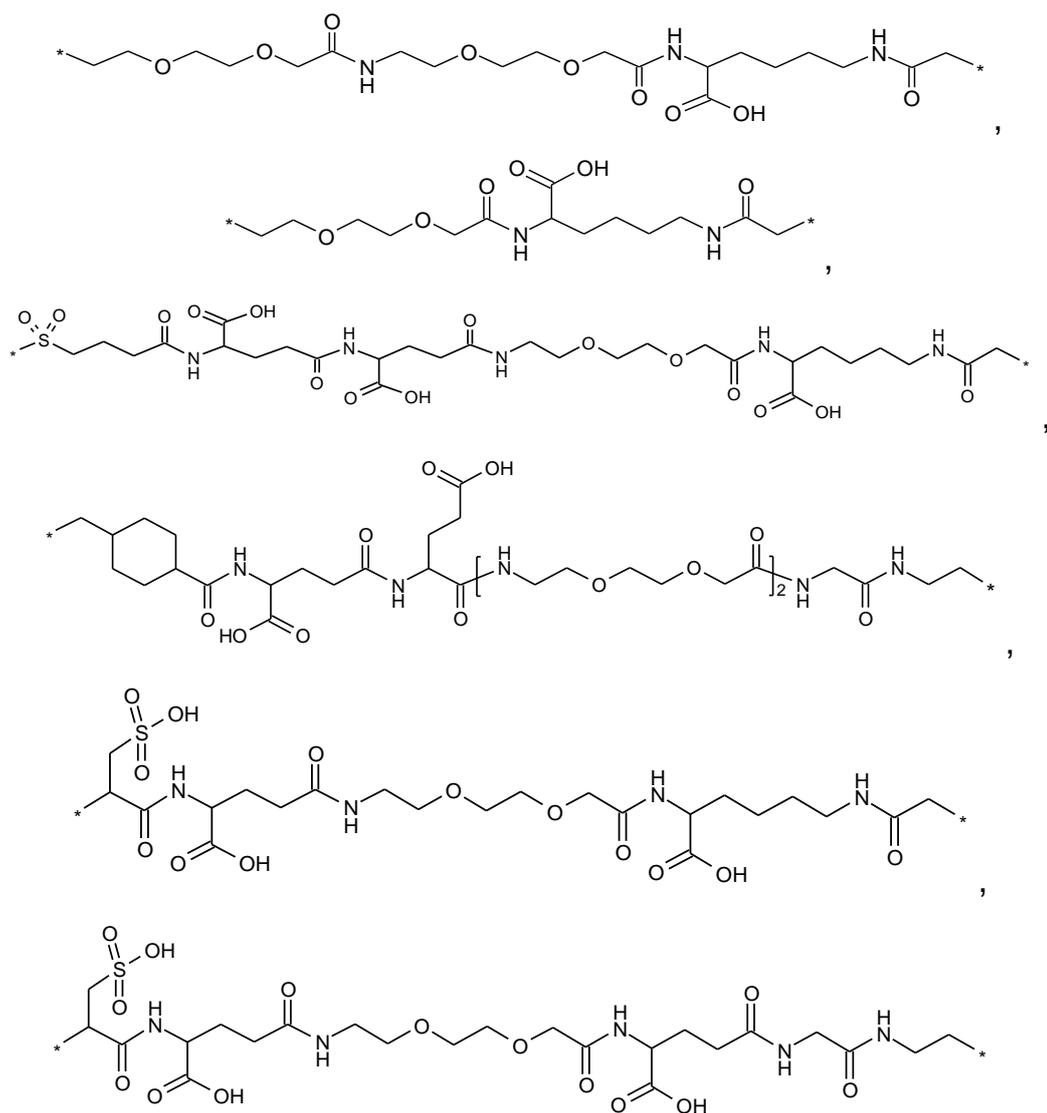
W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou

uma ligação de valência; em que  $s_1$  é 0 ou 1 e o grupo  $C_{1-6}$  alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  ou  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a  $X_4$ .

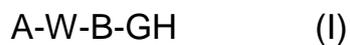
[000396] 23. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-22, em que  $X_4$  é uma ligação de valência e  $W_6$  é selecionado ou de pirrolidino-2,5-diona,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  ou  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$  em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a GH.

[000397] 24. O conjugado da modalidade 22, em que o espaçador hidrofílico é selecionado de





[000398] 25. Um conjugado de hormônio do crescimento em que o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I):



em que

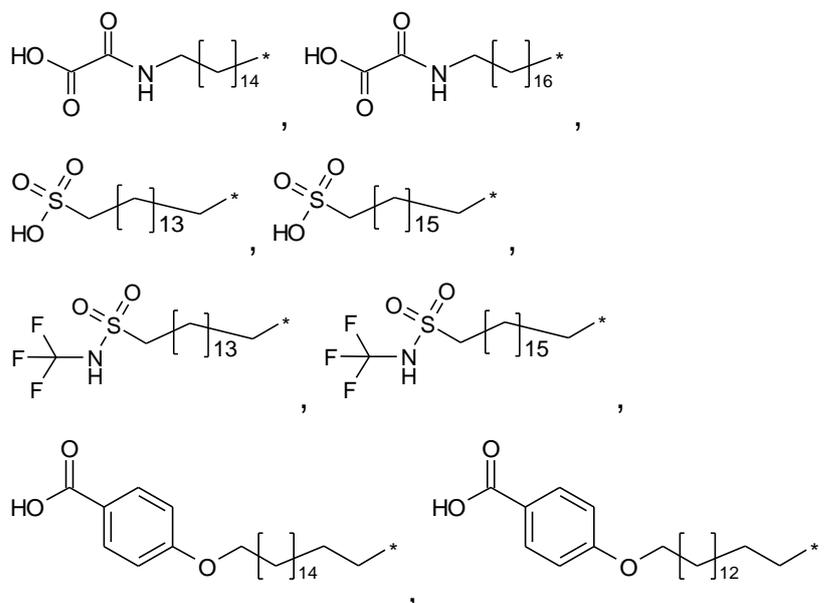
GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única,

B representa um espaçador hidrofílico ligado ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

W é um grupo químico ligando A e B, e

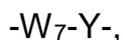
A representa um resíduo de ligação à albumina; e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.





em que \* indica a ligação de B através de W.

[000404] 31. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-30, em que W tem a fórmula



em que

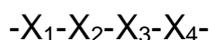
Y é  $-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$ -cicloalquila- $W_8-$  ou uma ligação de valência

$I7$  é 0-6,

$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , ou uma ligação de valência; em que  $s3$  é 0 ou 1,

$W_8$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s4$  é 0 ou 1.

[000405] 32. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-31, em que B tem a fórmula



em que

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

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

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

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ ,

$l1, l2, l3, l4, l5$  e  $l6$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m1, m3, m4, m6$  e  $m7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m2$  e  $m5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n1, n2, n3$  e  $n4$  são independentemente selecionados de 0-16,

$F$  é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  ou  $C_{1-6}$ -alquila,

$R^1, R^2, R^3, R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de hidrogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  ou  $-OH$ ,

$D1, D2, E1$  e  $E2$  são independentemente selecionados de  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  ou uma ligação de valência;  $R^6$  e  $R^7$  representam independentemente hidrogênio ou  $C_{1-6}$ -alquila,

$W_1$  a  $W_5$  são independentemente selecionados de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s2$  é 0 ou 1,

$W_6$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s1}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -alquila,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -alquila ou uma ligação de valência; em que  $s1$  é 0 ou 1 e o grupo  $C_{1-6}$  alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  ou  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a  $X_4$ .

[000406] 33. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-32, em que

$l1, l2, l3, l4, l5$  e  $l6$  são independentemente 0-6,  
 $m1, m3, m4, m6$  e  $m7$  são independentemente 0-6,  
 $m2$  e  $m5$  são independentemente 0-10, e  
 $n1, n2, n3$  e  $n4$  são independentemente 0-10.

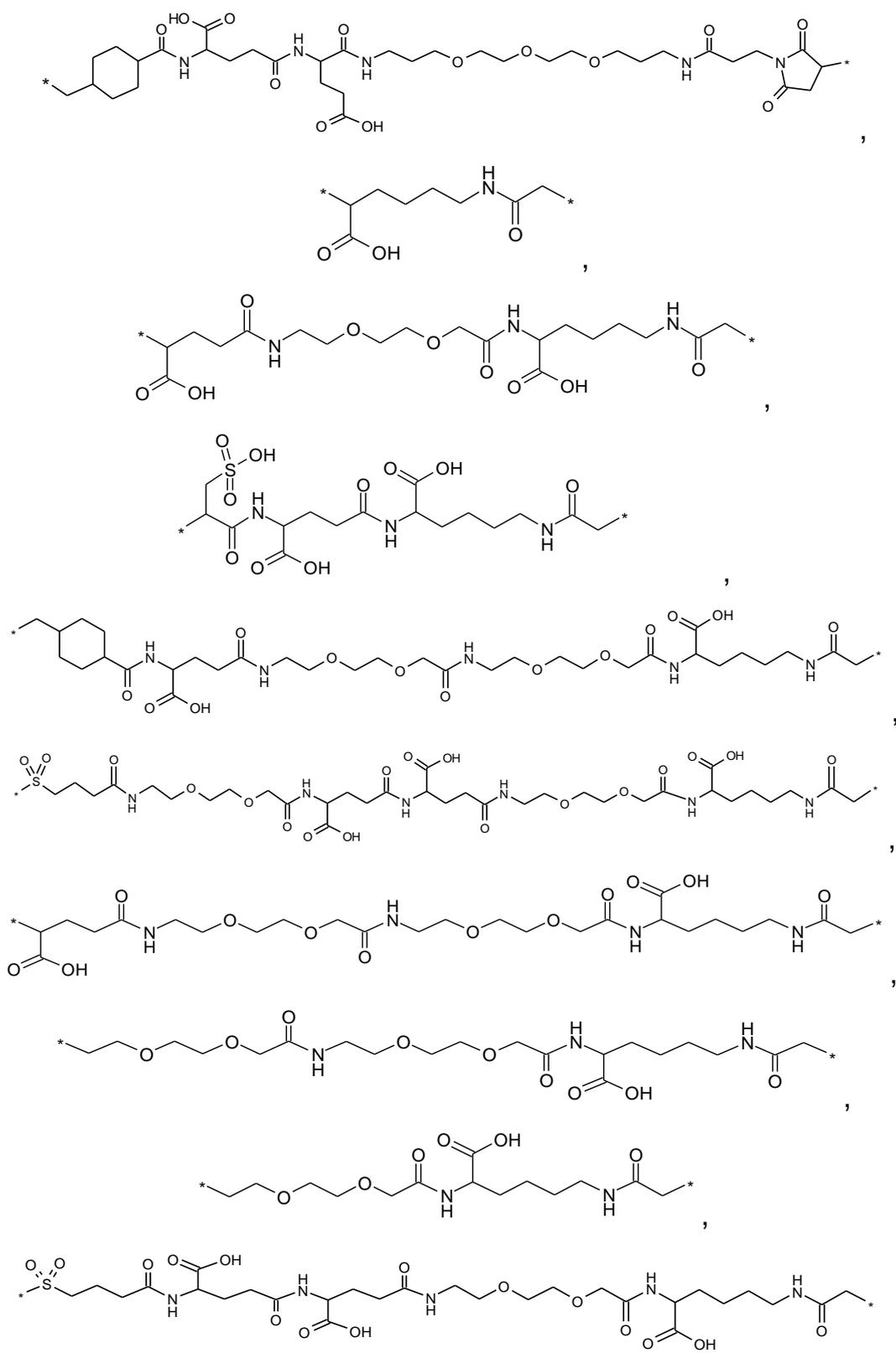
[000407] 34. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-33, em que  $D1$  e  $D2$  são independentemente selecionados de  $-O-$  ou  $-N(R^6)-$  ou uma ligação de valência.

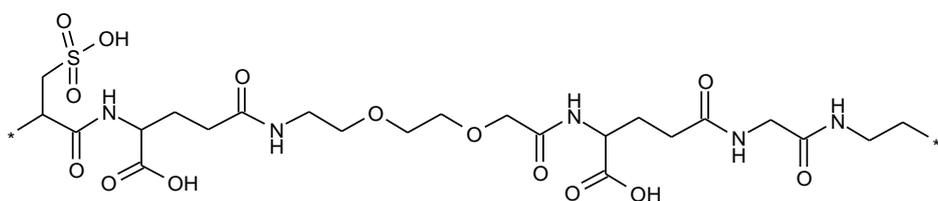
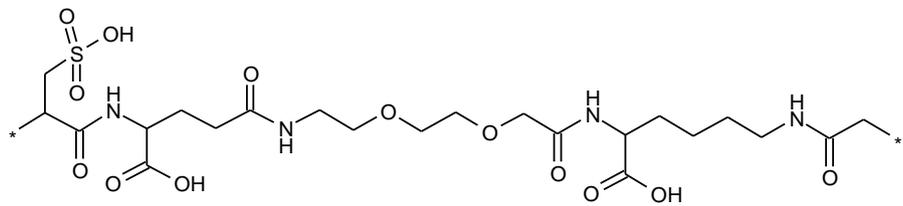
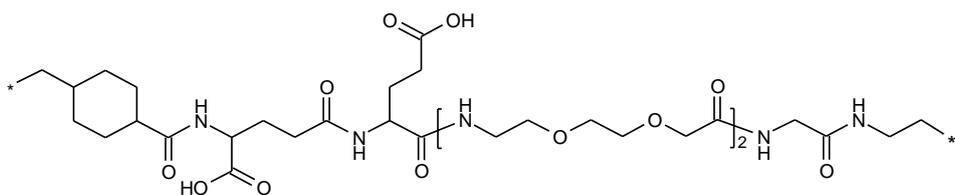
[000408] 35. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-34, em que  $E1$  e  $E2$  são independentemente selecionados de  $-O-$  ou  $-N(R^6)-$  ou uma ligação de valência.

[000409] 36. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-35, em que  $W_1$  a  $W_8$  são independentemente selecionados do grupo consistindo em  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -alquila,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  ou  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a  $X_4$ .

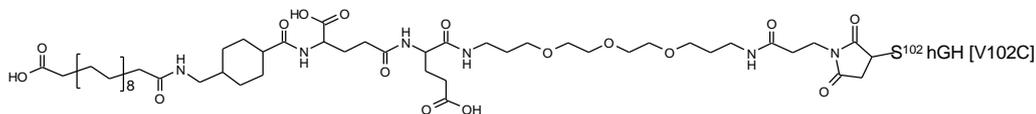
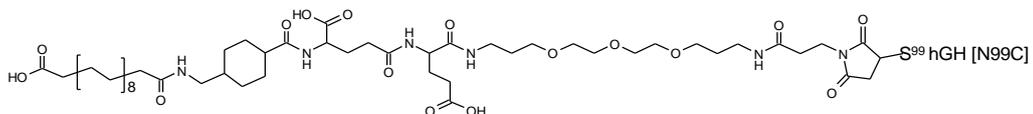
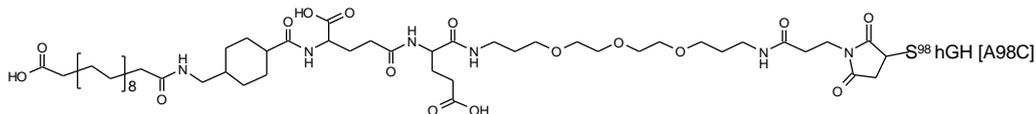
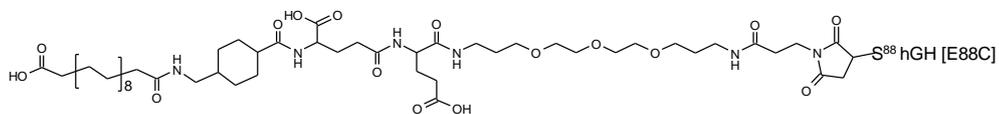
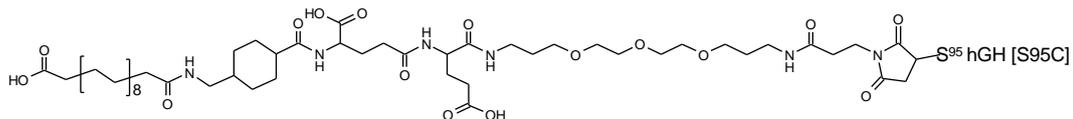
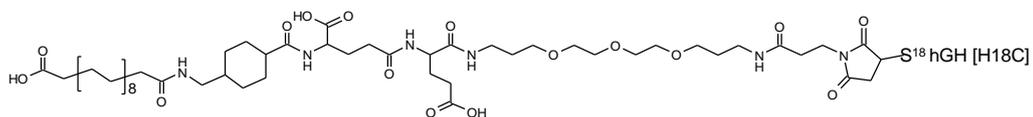
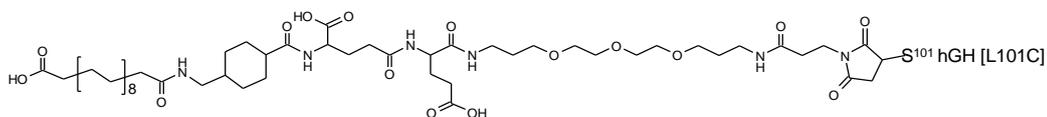
[000410] 37. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-36, em que  $R^1, R^2, R^3, R^4$  e  $R^5$  são independentemente selecionados de

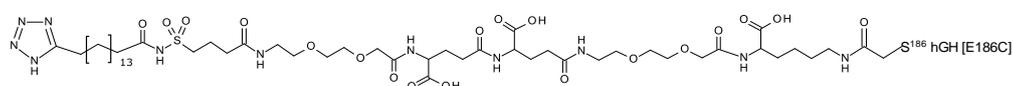
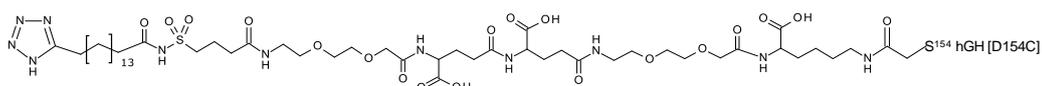
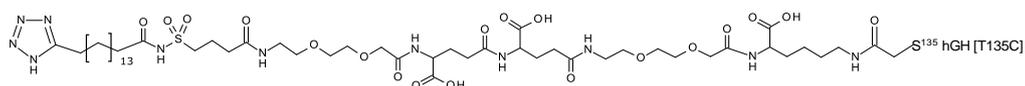
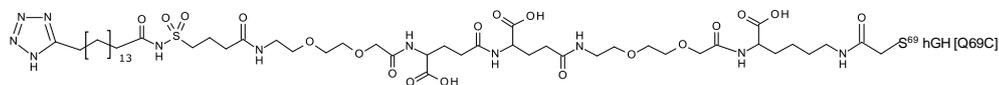
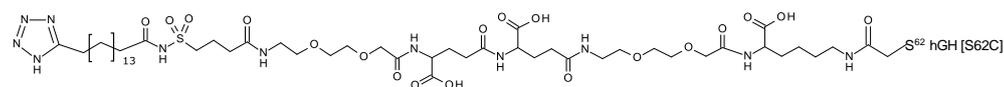
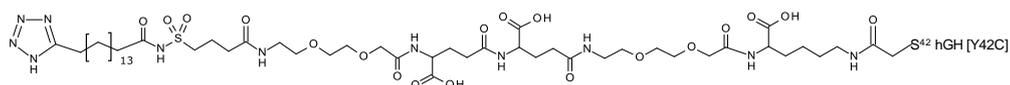
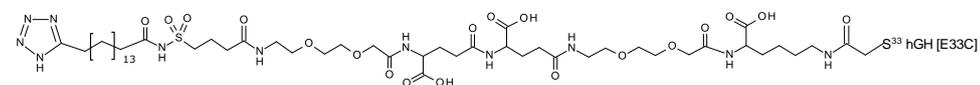
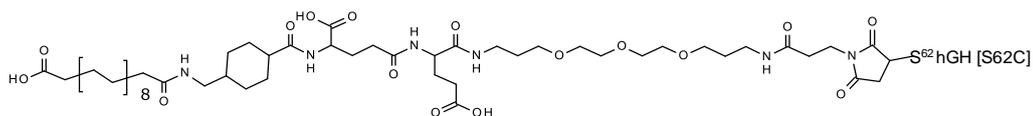
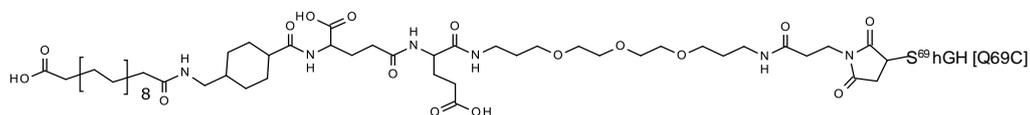
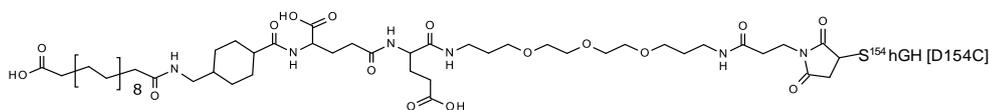
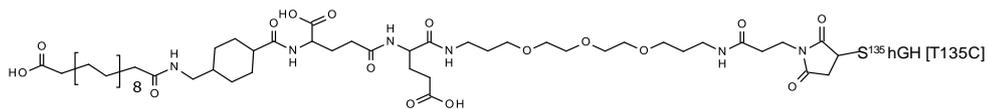
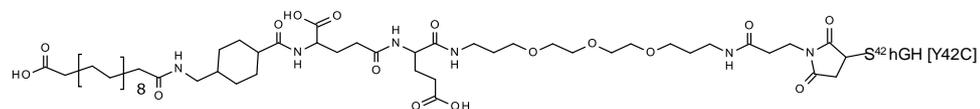
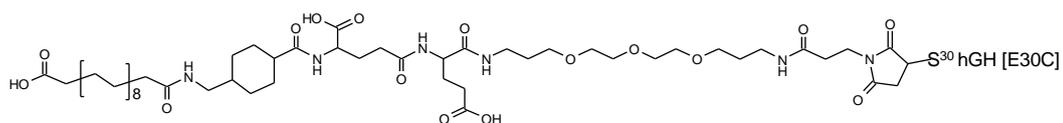






[000414] 41. O conjugado de qualquer uma das modalidades 25-40, em que o dito composto é selecionado de







[000415] 42. Um conjugado de hormônio do crescimento em que o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma ponte dissulfeto adicional,

B representa um espaçador hidrofílico,

W é um grupo de ligação químico A e B, e

A representa um resíduo de ligação à albumina; e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

[000416] 43. O conjugado da modalidade 42, em que o GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1), tal como pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade com hGH, ou GH é hGH (SEQ ID NO:1).

[000417] 44. O conjugado da modalidade 42, em que o GH ou os conjugados de GH têm pelo menos 80% da atividade do hormônio do crescimento de GH.

[000418] 45. O conjugado da modalidade 44, em que a atividade é medida em um ensaio BAF *in vitro* (ensaio I).

[000419] 46. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-45, em que o GH compreende ligações dissulfeto adicionais entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro de segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

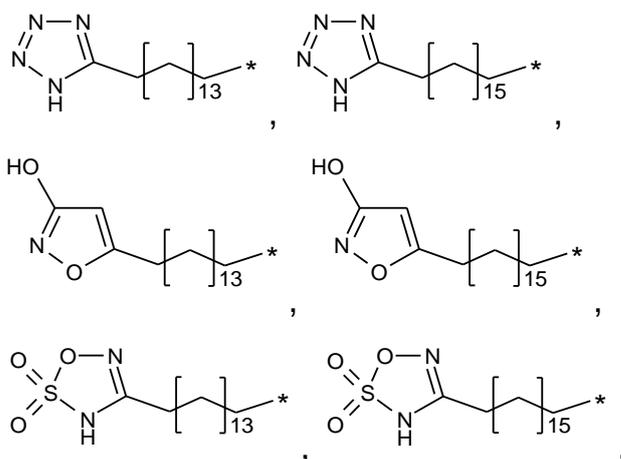
[000420] 47. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-46, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteínas está presente em um segmento de alça, tal como a partir dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

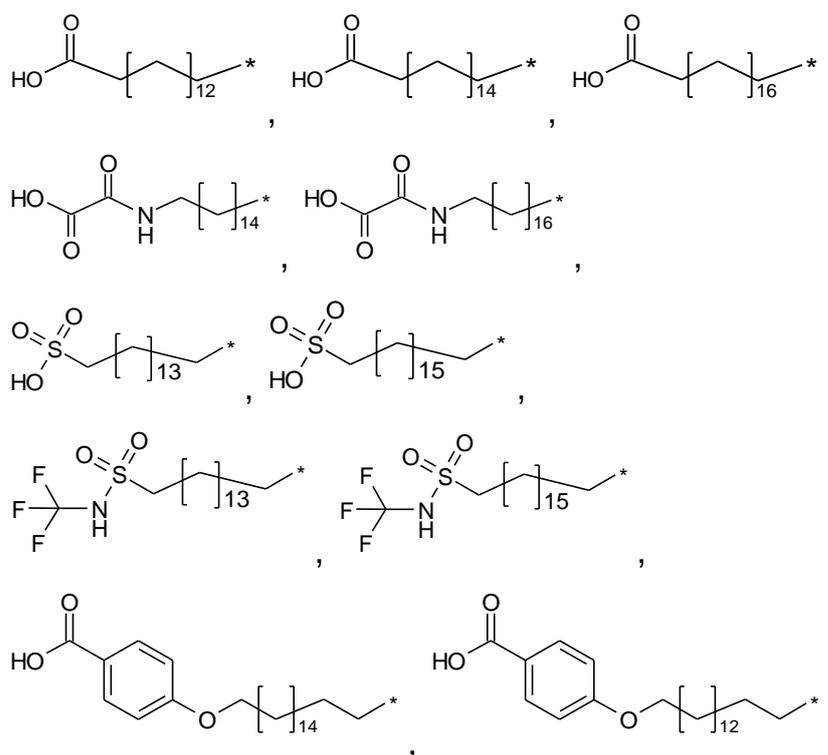
[000421] 48. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-47, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, com um segmento de hélice, tal como hélice B ou hélice 2.

[000422] 49. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-48, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que a ligação dissulfeto adicional conecta L3 (128-154) com a hélice B ou hélice 2.

[000423] 50. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-49, em que a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

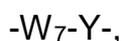
[000424] 51. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-50, em que A é selecionado de





em que \* indica a ligação a B através de W.

[000425] 52. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-51, em que W tem a fórmula



em que

Y é  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -cicloalquila- $W_8-$  ou uma ligação de valência

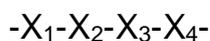
$17$  é 0-6,

$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s3$  é 0 ou 1,

$W_8$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s4$  é 0 ou

1.

[000426] 53. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-52, em que B tem a fórmula



em que

$X_1$  é  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ,

$X_2$  é  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ,

$X_3$  é  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ ,

$X_4$  é  $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ ,

$I1$ ,  $I2$ ,  $I3$ ,  $I4$ ,  $I5$  e  $I6$  são independentemente selecionados de 0-16,

$m1$ ,  $m3$ ,  $m4$ ,  $m6$  e  $m7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$m2$  e  $m5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$n1$ ,  $n2$ ,  $n3$  e  $n4$  são independentemente selecionados de 0-16,

F é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

D1, D2, E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência, em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -

S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>2</sub> é 0 ou 1,

W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que s<sub>1</sub> é 0 ou 1 e o grupo C<sub>1-6</sub> alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000427] 54. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-53, em que

l<sub>1</sub>, l<sub>2</sub>, l<sub>3</sub>, l<sub>4</sub>, l<sub>5</sub> e l<sub>6</sub> são independentemente 0-6,  
m<sub>1</sub>, m<sub>3</sub>, m<sub>4</sub>, m<sub>6</sub> e m<sub>7</sub> são independentemente 0-6,  
m<sub>2</sub> e m<sub>5</sub> são independentemente 0-10, e  
n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> e n<sub>4</sub> são independentemente 0-10.

[000428] 55. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-54, em que D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

[000429] 56. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-55, em que E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

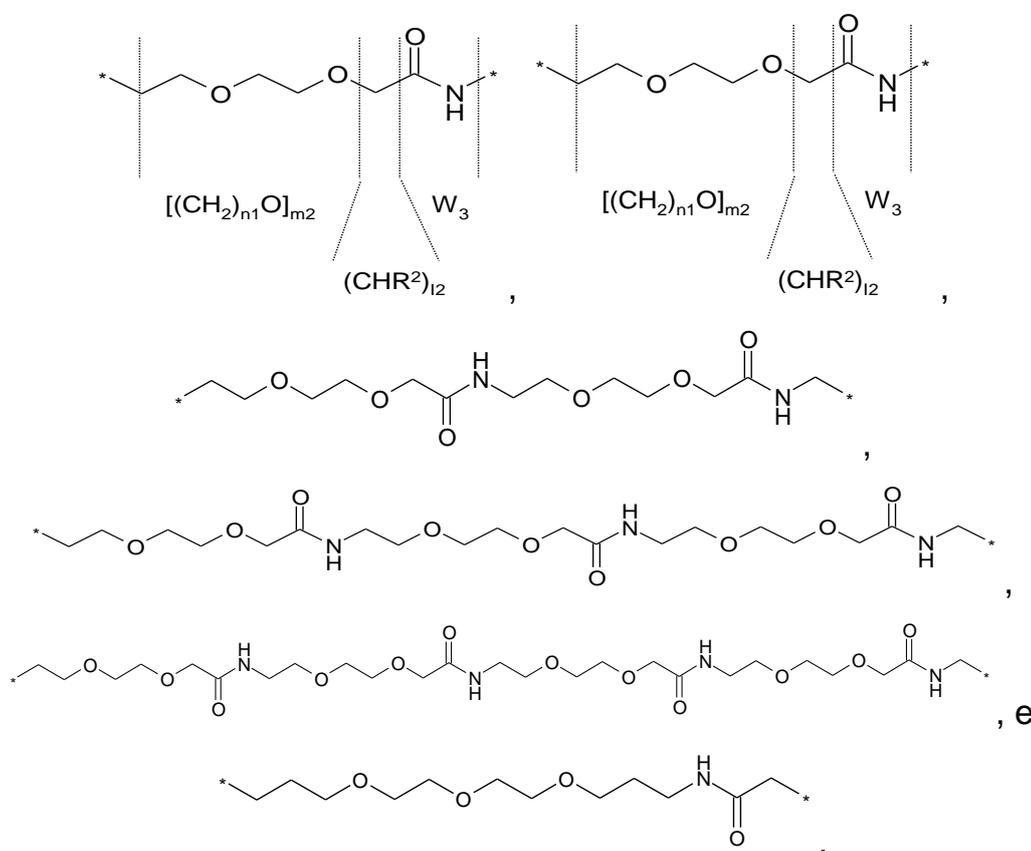
[000430] 57. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-56, em que W<sub>1</sub> a W<sub>8</sub> são independentemente selecionados do grupo consistindo em -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila ou -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo

de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000431] 58. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-57, em que -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

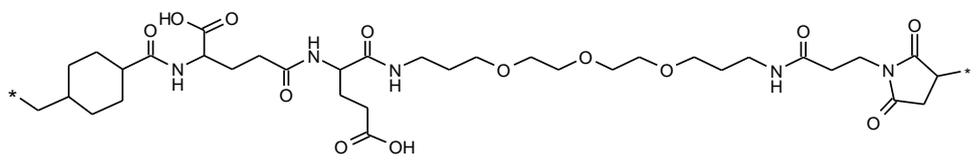
[000432] 59. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-58, em que

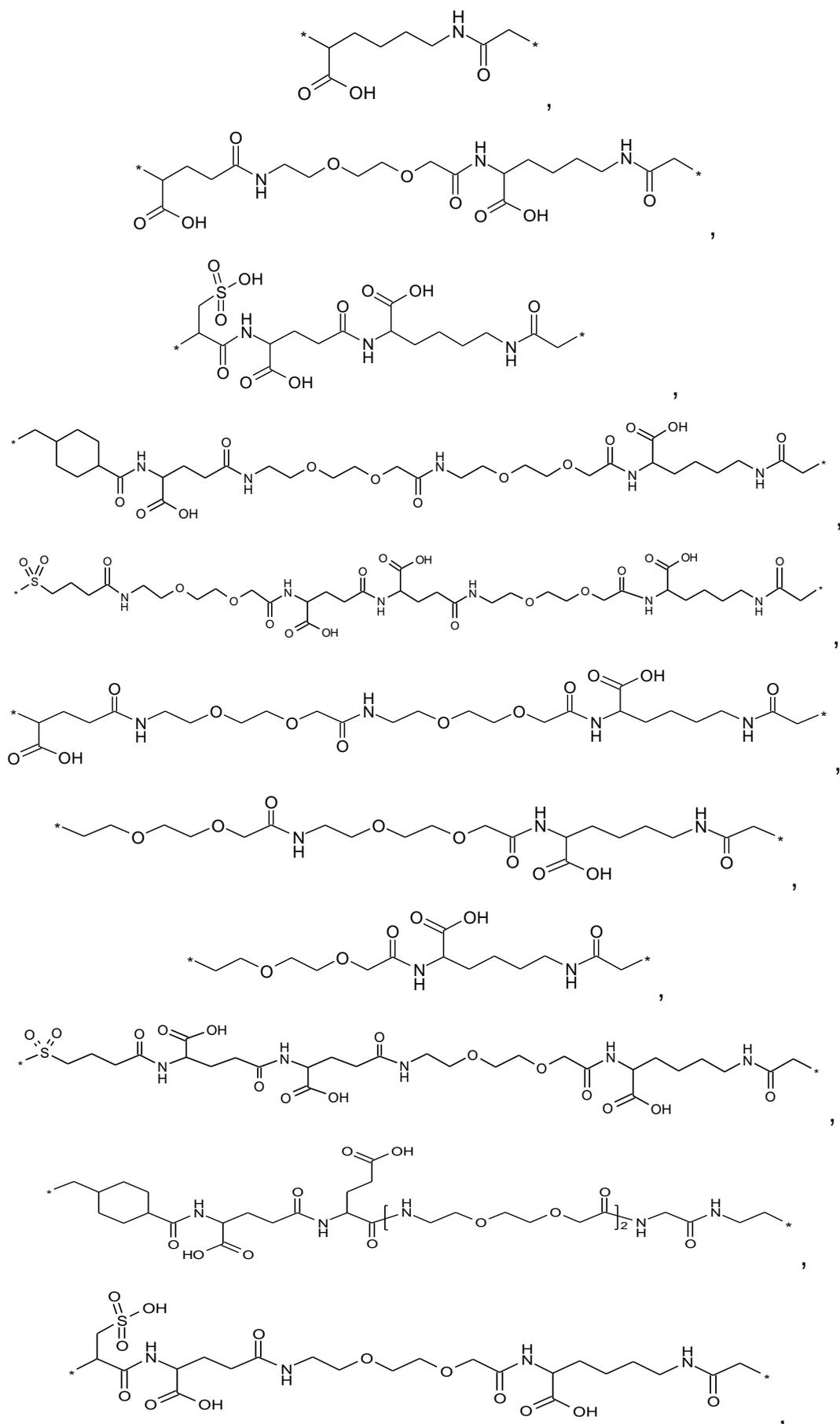
$-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{l2}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$  e  $-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-$   
 $[(\text{CHR}^4)_{l4}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$ , em que E1 e E2 são -O-, são seleccionados de

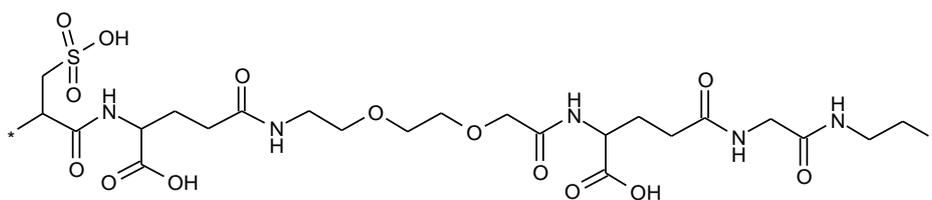


em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

[000433] 60. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-59, em que B é seleccionado de

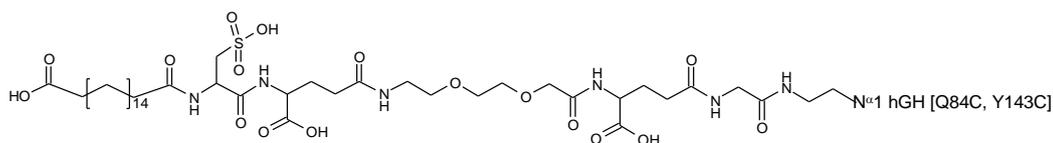
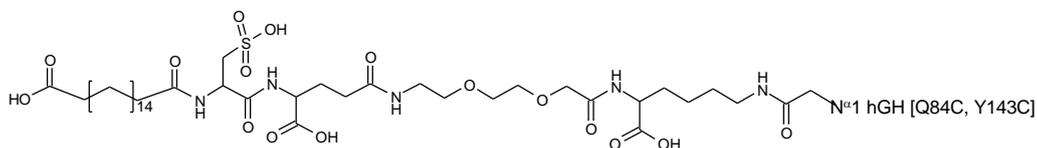
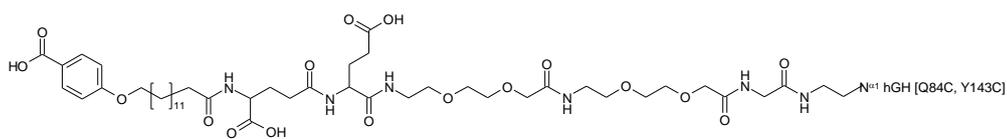
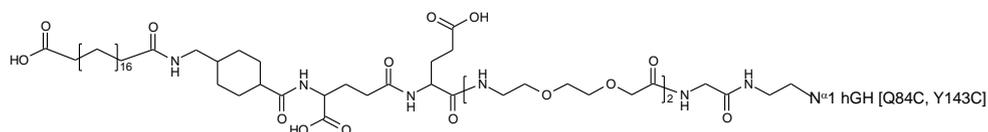






[000434] 61. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-60, em que A através de B é ligado ao resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40, posição 141 em hGH SEQ ID NO:1 ou o resíduo N-terminal do composto de hormônio do crescimento.

[000435] 62. O conjugado de qualquer uma das modalidades 42-61, em que o dito composto é selecionado de



[000436] 63. Um conjugado de hormônio do crescimento em que o conjugado de hormônio do crescimento tem a fórmula (I):



em que

GH representa um composto de hormônio do crescimento tendo uma mutação de Cys única e uma ponte dissulfeto adicional,

B representa um espaçador hidrofílico ligado ao resíduo de enxofre da mutação de Cys,

W é um grupo químico ligando A e B, e

A representa um resíduo de ligação à albumina; e  
seus sais farmacologicamente aceitáveis;

[000437] 64. O conjugado da modalidade 63, em que GH representa um composto de hormônio do crescimento compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácido de hormônio do crescimento humano (hGH) (SEQ ID NO:1), tal como pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 80% ou pelo menos 95% de identidade com hGH, ou GH é hGH (SEQ ID NO:1).

[000438] 65. O conjugado da modalidade 64, em que GH ou o conjugado de GH tem pelo menos 80% da atividade do hormônio do crescimento de hGH.

[000439] 66. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-65, em que a mutação de Cys única está posicionada em qualquer uma das regiões selecionadas do terminal N, H1, H2, L2 ou H3 de GH.

[000440] 67. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-66, em que o GH tem uma mutação de Cys única selecionada de qualquer uma 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 e G190C, tal como qualquer uma de; T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C e G126C.

[000441] 68. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-67, em que a ligação dissulfeto adicional é entre um segmento de alça e um segmento de hélice ou dentro do segmento de alça ou entre segmentos de alça ou entre segmentos de hélice.

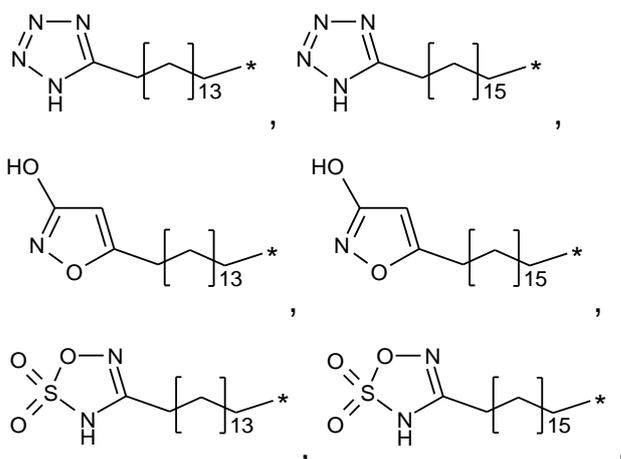
[000442] 69. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-68, em que o GH compreende uma ligação dissulfeto adicional em que pelo menos uma das cisteína está presente em um segmento de alça, tal como dos resíduos de aminoácido 128-154 (L3).

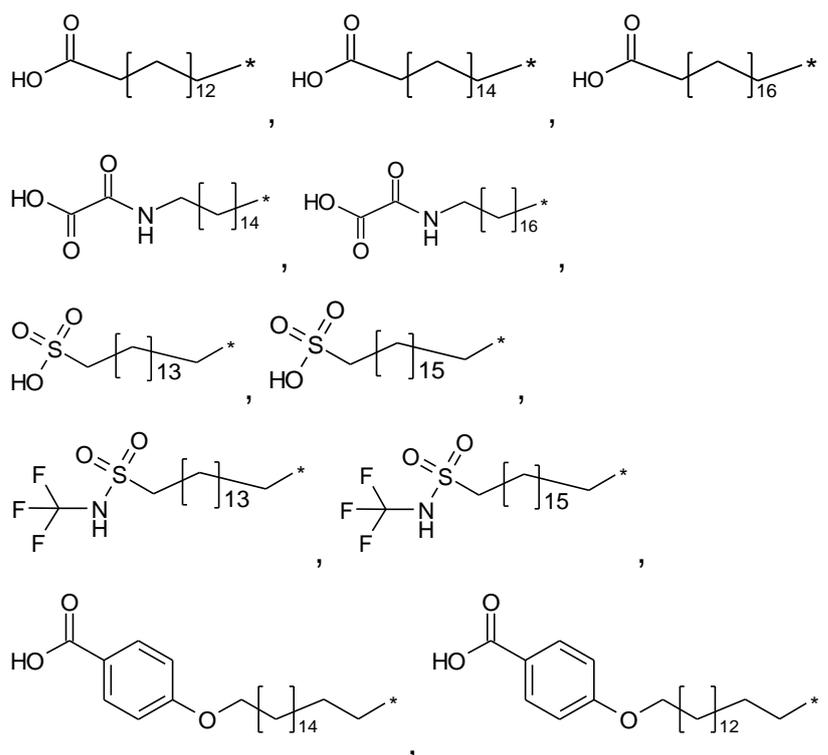
[000443] 70. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-69, em que a ligação dissulfeto adicional conecta um segmento de alça, com um segmento de hélice, tal como H2.

[000444] 71. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-70, em que a ligação dissulfeto adicional conecta L3 com a hélice H2.

[000445] 72. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-71, em que a ponte dissulfeto adicional está entre pelo menos um dos pares de aminoácido nas posições correspondendo 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 e/ou V185C/S188C em hGH (SEQ ID NO: 1), tal como Q84C/Y143C.

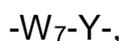
[000446] 73. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-72, em que A é selecionado de





em que \* indica a ligação a B através de W.

[000447] 74. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-73, em que W tem a fórmula



em que

Y é  $-(CH_2)_{l7}-C_{3-10}$ -cicloalquila- $W_8-$  ou uma ligação de valência

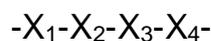
$l7$  é 0-6,

$W_7$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s3$  é 0 ou 1,

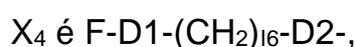
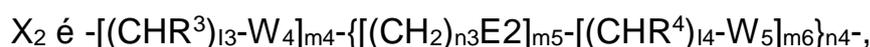
$W_8$  é selecionado de  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$  ou uma ligação de valência; em que  $s4$  é 0 ou

1.

[000448] 75. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-74, em que B tem a fórmula



em que



I1, I2, I3, I4, I5 e I6 são independentemente selecionados de 0-16,

m1, m3, m4, m6 e m7 são independentemente selecionados de 0-10,

m2 e m5 são independentemente selecionados de 0-25,

n1, n2, n3 e n4 são independentemente selecionados de 0-16,

F é arila, hetarila, pirrolidino-2,5-diona ou uma ligação de valência em que os grupos arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

D1, D2, E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -

S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s<sub>2</sub> é 0 ou 1,

W<sub>6</sub> é selecionado de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que s<sub>1</sub> é 0 ou 1 e o grupo C<sub>1-6</sub> alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000449] 76. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-75, em que

l<sub>1</sub>, l<sub>2</sub>, l<sub>3</sub>, l<sub>4</sub>, l<sub>5</sub> e l<sub>6</sub> são independentemente 0-6,  
m<sub>1</sub>, m<sub>3</sub>, m<sub>4</sub>, m<sub>6</sub> e m<sub>7</sub> são independentemente 0-6,  
m<sub>2</sub> e m<sub>5</sub> são independentemente 0-10, e  
n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>, n<sub>3</sub> e n<sub>4</sub> são independentemente 0-10.

[000450] 77. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-75, em que D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

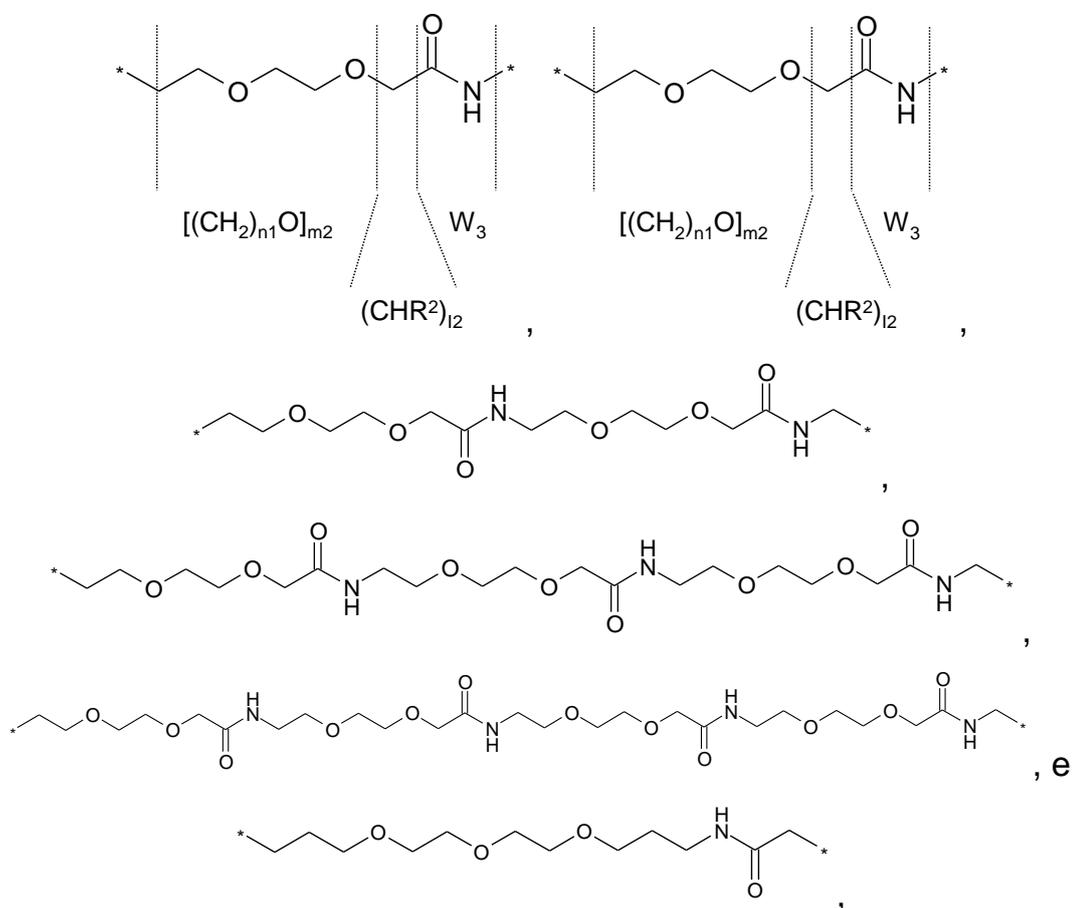
[000451] 78. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-77, em que E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> são independentemente selecionados de -O- ou -N(R<sup>6</sup>)- ou uma ligação de valência.

[000452] 79. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-78, em que W<sub>1</sub> a W<sub>8</sub> são independentemente selecionados do grupo consistindo em -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-alquila ou -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-alquila ou uma ligação de valência; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com oxo, pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH; em que ( \* ) indica o ponto de ligação do átomo

de carbono de CH a X<sub>4</sub>.

[000453] 80. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-79, em que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH ou C<sub>1-6</sub>-alquila; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído com -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> ou -S(O)<sub>2</sub>OH.

[000454] 81. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-80, em que -{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>E1]<sub>m2</sub>-[(CHR<sup>2</sup>)<sub>l2</sub>-W<sub>3</sub>]<sub>m3</sub>}<sub>n2</sub>- e -{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>E2]<sub>m5</sub>-[(CHR<sup>4</sup>)<sub>l4</sub>-W<sub>5</sub>]<sub>m6</sub>}<sub>n4</sub>-, em que E1 e E2 são -O-, são selecionados de

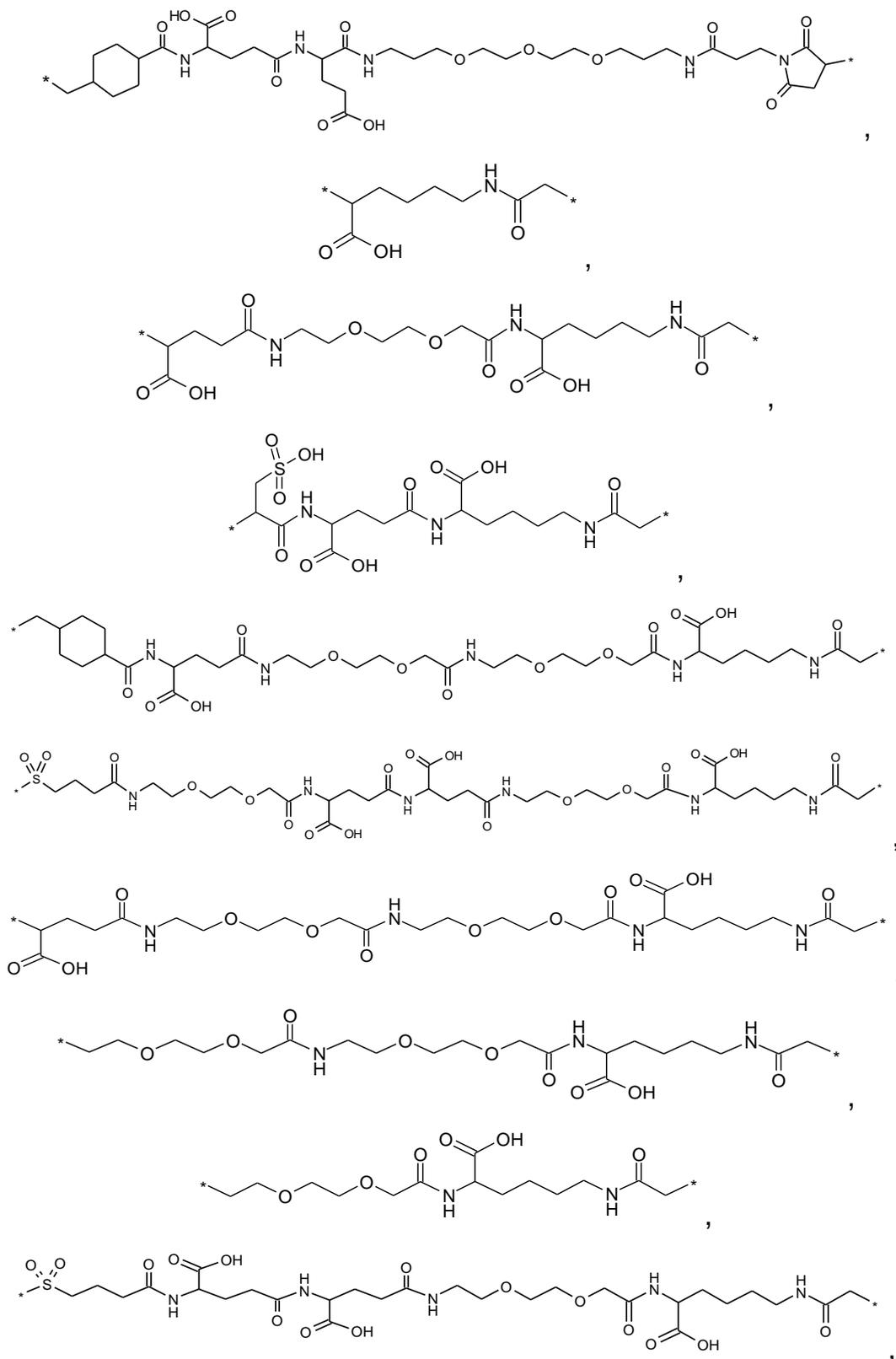


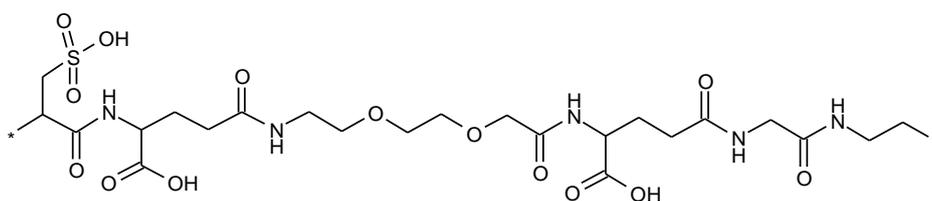
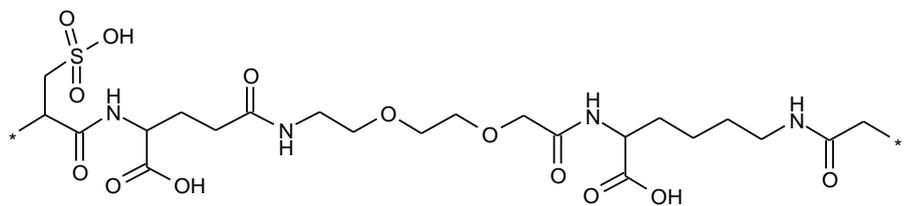
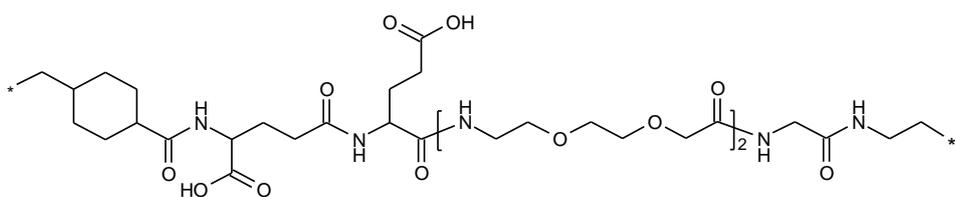
em que \* pretende indicar um ponto de ligação, isto é, uma ligação aberta.

[000455] 82. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-81, em que X<sub>4</sub> é uma ligação de valência e W<sub>6</sub> é selecionado ou de pirrolidino-2,5-diona, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH ou -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH em que (\*) indica o ponto de ligação do átomo

de carbono de CH a GH.

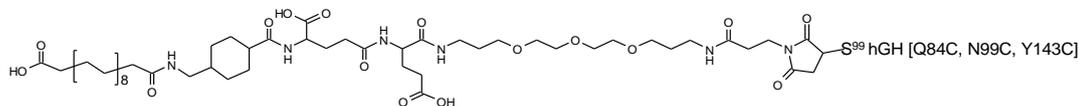
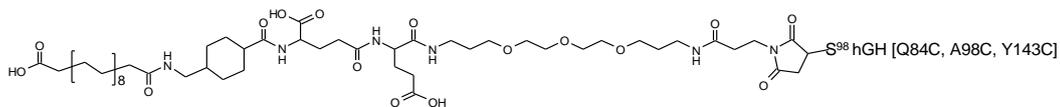
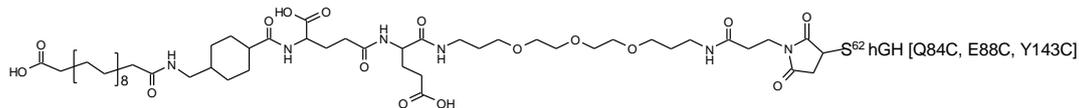
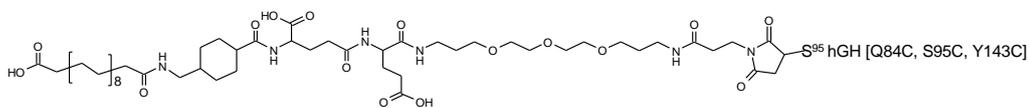
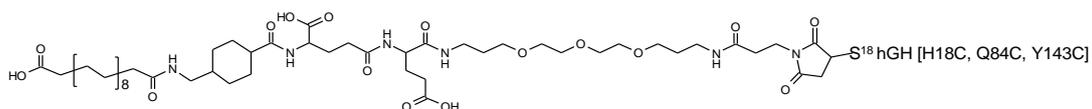
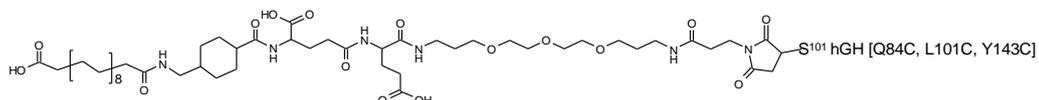
[000456] 83. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-82, em que B é selecionado de

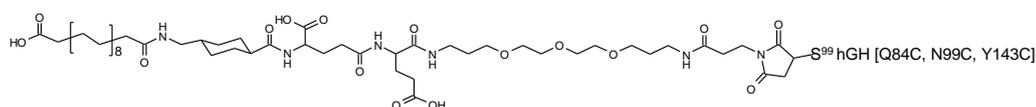
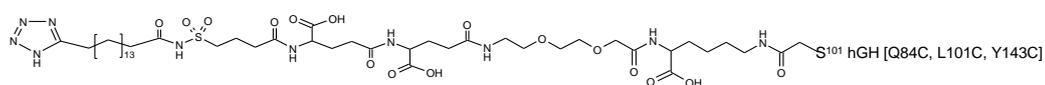
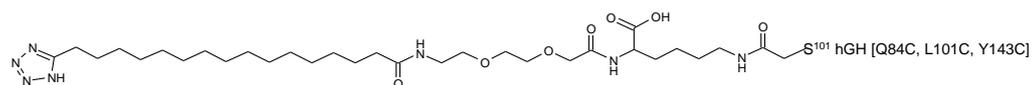
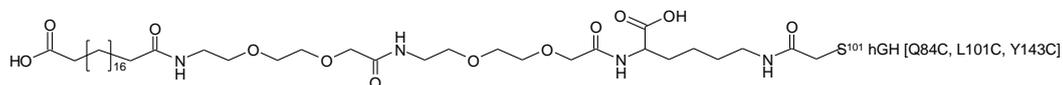
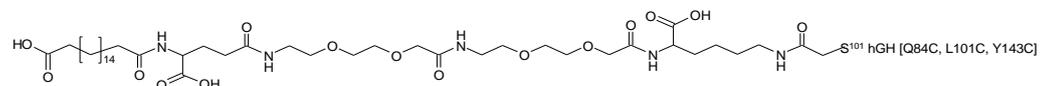
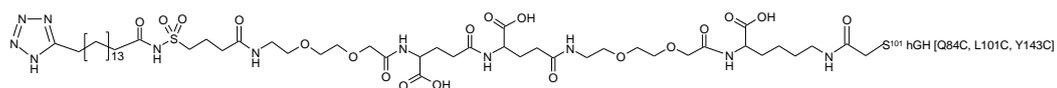
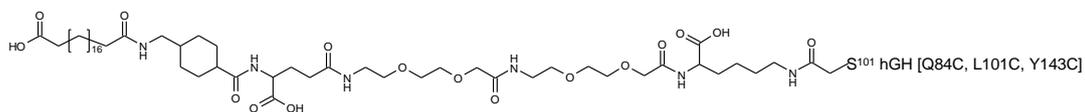
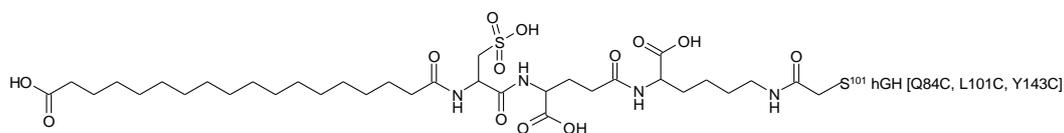
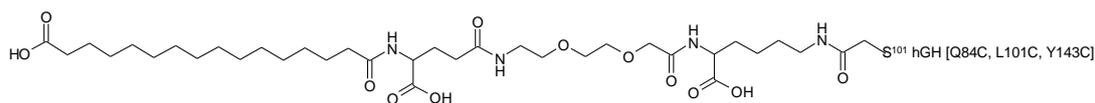
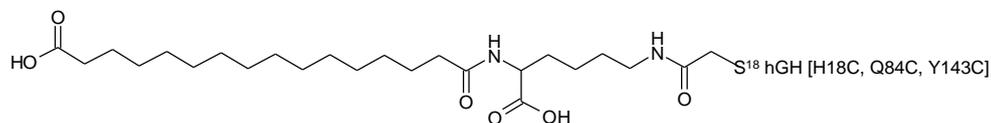
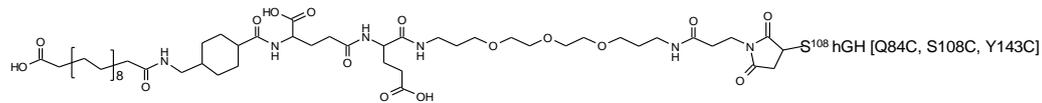
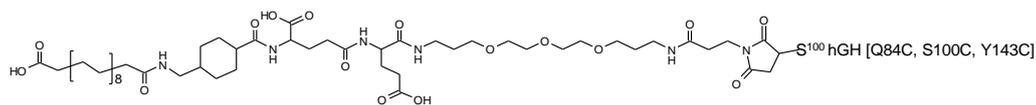
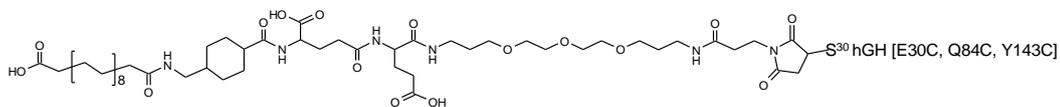
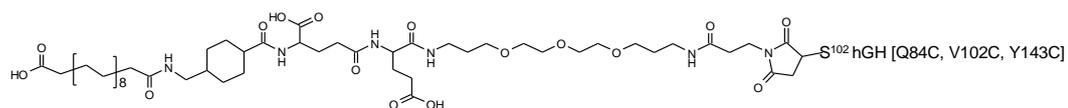


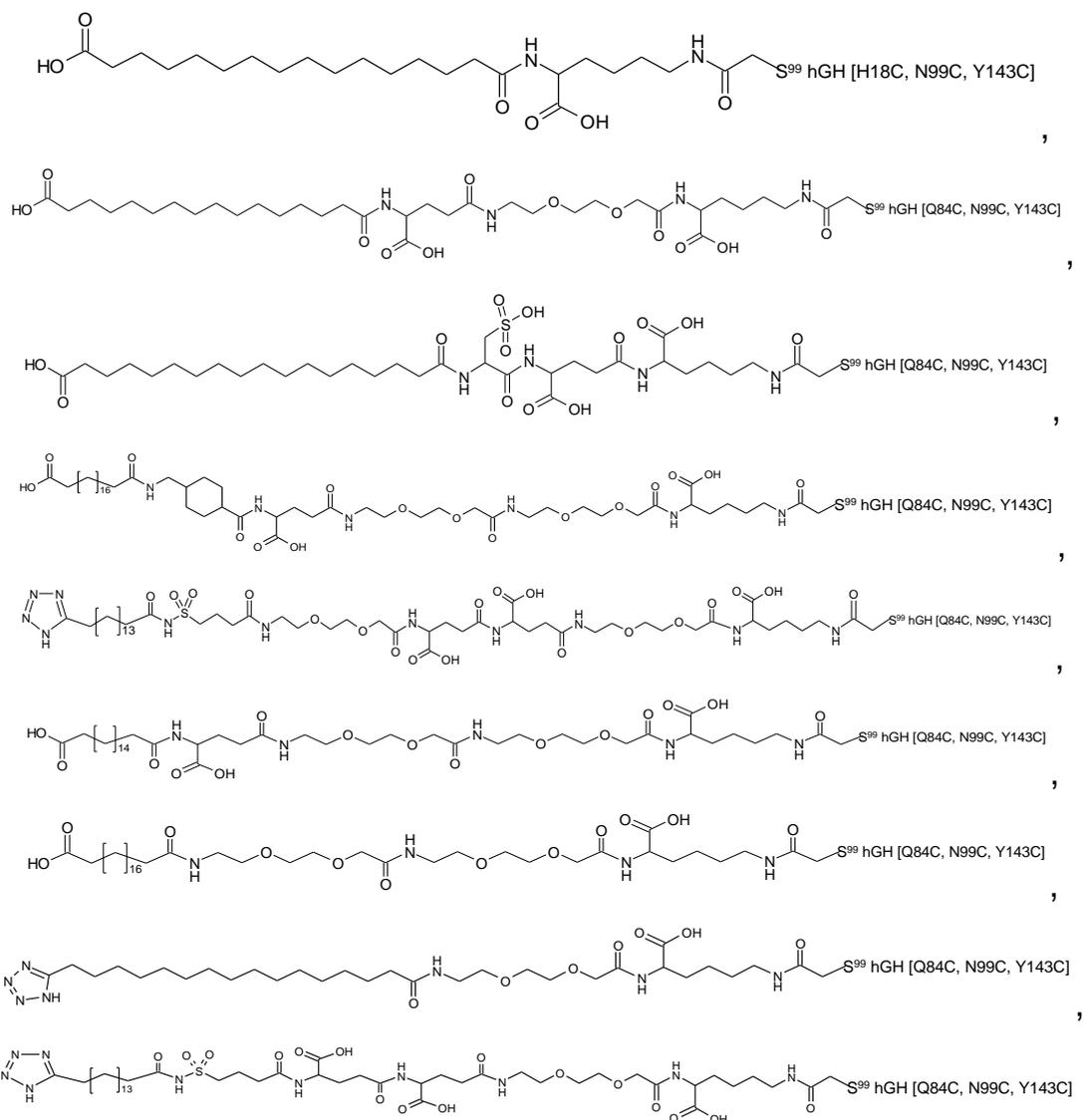


[000457] 84. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-83, em que um resíduo de ligação à albumina (A) através de um espaçador hidrofílico (B) é ligado ao dito GH.

[000458] 85. O conjugado de qualquer uma das modalidades 63-84, em que o dito composto é selecionado de







[000459] 86. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-85, em que o espaçador hidrofílico tem  $m\text{LogP} < 0$ .

[000460] 87. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-86, em que o peso molar do dito espaçador hidrofílico está na faixa de 80 D a 1500 D ou na faixa de a partir de 300 D a 1100 D.

[000461] 88. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-87, em que o dito resíduo de ligação à albumina é um resíduo lipofílico.

[000462] 89. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-88, em que o dito resíduo de ligação à albumina se liga não covalentemente à albumina.

[000463] 90. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-89,

em que o dito resíduo de ligação à albumina é negativamente carregado em pH fisiológico.

[000464] 91. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-90, em que o dito resíduo de ligação à albumina tem uma afinidade de ligação com relação à albumina de soro humano que está abaixo de cerca de 10  $\mu\text{M}$  ou abaixo de cerca de 1  $\mu\text{M}$ .

[000465] 92. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-91, em que o dito resíduo de ligação à albumina é selecionado de um grupo alquila de cadeia reta, um grupo alquila ramificado, um grupo que tem um grupo de ácido  $\omega$ -carboxílico ou um isoéster do ácido  $\omega$ -carboxílico.

[000466] 93. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-92, em que o dito resíduo de ligação à albumina tem de a partir de 6 a 40 átomos de carbono, de a partir de 8 a 26 átomos de carbono ou de a partir de 8 a 20 átomos de carbono.

[000467] 94. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-93, em que o dito resíduo de ligação à albumina é um peptídeo, tal como um peptídeo compreendendo menos do que 40 resíduos de aminoácido.

[000468] 95. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-94, em que os resíduos de ligação à albumina (A) através de um espaçador hidrofílico (B) são ligados ao dito GH.

[000469] 96. O conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95 para uso em terapia.

[000470] 97. Composição farmacêutica compreendendo um conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95, opcionalmente em combinação com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[000471] 98. Uma composição farmacêutica da modalidade 97, em que a dita composição pode ser administrada através de lingual, sublingual, bucal, na boca, oral, no estômago e intestino, nasal,

pulmonar, epidermal, dermal, transdermal e parenteral a pacientes.

[000472] 99. Um método de tratamento de deficiência de hormônio do crescimento (GHD), o método compreendendo administração a um paciente com necessidade do mesmo de uma quantidade eficaz de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95.

[000473] 100. Método de tratamento de Síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS) (*Prader-Willi syndrome*); síndrome de Noonan; síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatoide juvenil; fibrose cística; infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas nascidas baixas para a idade gestacional (SGA) (*Short for Gestational Age*); estatura baixa em crianças nascidas com peso para o nascimento muito baixo (VLBW) (*Very Low Birth Weight*) exceto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS) (*Idiopathic Short Stature*); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tais como tíbia, fíbula, fêmur, humero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso e dedo; fraturas em ou de ossos esponjosos, tais como o crânio, base da mão e base do pé; pacientes após cirurgia do tendão ou ligamento em, por exemplo, mão, joelho ou ombro; pacientes tendo ou sofrendo de osteogênese por distração; pacientes após substituição do quadril ou disco, reparo do menisco, fusões espinhais ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, cotovelo, pulso ou maxilar; pacientes em que material de osteossíntese, tais como unhas, parafusos e placas, foi fixado; pacientes com não união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo, da tíbia ou 1º dedo; pacientes após implante de enxerto; degeneração da cartilagem articular em joelho causada por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica

(APCD); doença cardiovascular associada à má nutrição em APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idoso com APCD; doença hepática crônica em APCD, síndrome da fadiga em APDC; doença de Chron; função hepática prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome do intestino curto; obesidade central; síndrome da lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva grande, desintoxicação de álcool/droga ou trauma neurológico; envelhecimento; idoso fraco; osteoartrite; cartilagem traumáticamente lesionada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; lesão cerebral traumática; hemorragia subaracnóide; peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; ou estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças, a aceleração de cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; a aceleração ou melhora do fluxo de sangue para tecido lesionado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido lesionado, o método compreendendo administrar a um paciente com necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95.

[000474] 101. O uso de um conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95 na fabricação de um medicamento para o tratamento de deficiência do hormônio do crescimento (GHD).

[000475] 102. O uso de um conjugado de qualquer uma das modalidades 1-95 na fabricação de um medicamento para o tratamento de Síndrome de Turner; síndrome de Prader-Willi (PWS) (*Prader-Willi syndrome*); síndrome de Noonan; síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatoide juvenil; fibrose cística; infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas nascidas baixas para a idade gestacional

(SGA) (*Short for Gestational Age*); estatura baixa em crianças nascidas com peso para o nascimento muito baixo (VLBW) (*Very Low Birth Weight*) exceto SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS) (*Idiopathic Short Stature*); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tais como tíbia, fíbula, fêmur, humero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso e dedo; fraturas em ou de ossos esponjosos, tais como o crânio, base da mão e base do pé; pacientes após cirurgia do tendão ou ligamento em, por exemplo, mão, joelho ou ombro; pacientes tendo ou sofrendo de osteogênese por distração; pacientes após substituição do quadril ou disco, reparo do menisco, fusões espinhais ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, cotovelo, pulso ou maxilar; pacientes em que material de osteossíntese, tais como unhas, parafusos e placas, foi fixado; pacientes com não união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo, da tíbia ou 1º dedo; pacientes após implante de enxerto; degeneração da cartilagem articular em joelho causada por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular associada à má nutrição em APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idoso com APCD; doença hepática crônica em APCD, síndrome da fadiga em APCD; doença de Chron; função hepática prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome do intestino curto; obesidade central; síndrome da lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva grande, desintoxicação de álcool/droga ou trauma neurológico; envelhecimento; idoso fraco; osteoartrite; cartilagem traumáticamente lesionada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; lesão cerebral traumática; hemorragia subaracnóide;

peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; ou estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças, a aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; a aceleração ou melhora de fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido lesionado.

[000476] 103. Um composto de fórmula (III)



em que A representa um resíduo de ligação à albumina,

B1 representa um espaçador hidrofílico,

W é um grupo químico ligando A e B1 e U representa uma porção de conjugação.

[000477] 104. O composto de acordo com a modalidade 103, em que A e W são conforme definido em qualquer uma das modalidades acima.

[000478] 105. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende ou consiste em uma arila, uma hetarila, uma malimida substituída ou uma pirrolidino-2,5-diona tal como -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-pirrolidin-2,5-diona.

[000479] 106. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende D1-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-D2, em que D1 e D2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R6)-, -NC(O)R7- ou uma ligação de valência; em que R6 e R7 representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila.

[000480] 107. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende ou consiste em um grupo de saída, tal como Cl, Br, I, -OH, -OS(O)<sub>2</sub>Me, -OS(O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -Ots.

[000481] 108. O composto de acordo com a modalidade 107, em que o grupo de saída é um composto de halogênio selecionado de Cl, Br e I, preferivelmente Br.

[000482] 109. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende ou consiste em uma alil amina ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), tal como  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ .

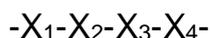
[000483] 110. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende ou consiste em uma amina, tal como  $-\text{NH}_2$ .

[000484] 111. O composto de acordo com qualquer uma das modalidades 103-110, em que o composto terapêutico é um polipeptídeo.

[000485] 112. O composto de acordo com qualquer uma das modalidades 103-110, em que o composto terapêutico é um polipeptídeo com uma cisteína livre única.

[000486] 113. O composto de acordo com a modalidade 103 ou modalidade 104, em que U compreende ou consiste em um aldeído, tal como  $-\text{CHO}$ .

[000487] 114. O composto de acordo com qualquer uma das modalidades 103-113, em que o espaçador hidrofílico B1 tem a fórmula



em que

$\text{X}_1$  é  $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^1)_{\text{I}1}-\text{W}_2]_{\text{m}1}-\{[(\text{CH}_2)_{\text{n}1}\text{E}1]_{\text{m}2}-[(\text{CHR}^2)_{\text{I}2}-\text{W}_3]_{\text{m}3}\}_{\text{n}2}-$ ,

$\text{X}_2$  é  $-\{[(\text{CHR}^3)_{\text{I}3}-\text{W}_4]_{\text{m}4}-\{[(\text{CH}_2)_{\text{n}3}\text{E}2]_{\text{m}5}-[(\text{CHR}^4)_{\text{I}4}-\text{W}_5]_{\text{m}6}\}_{\text{n}4}-$ ,

$\text{X}_3$  é  $-\{[(\text{CHR}^5)_{\text{I}5}]_{\text{m}7}-$ ,

$\text{X}_4$  é uma ligação de valência,

$\text{I}1$ ,  $\text{I}2$ ,  $\text{I}3$ ,  $\text{I}4$  e  $\text{I}5$  são independentemente selecionados de 0-16,

$\text{m}1$ ,  $\text{m}3$ ,  $\text{m}4$ ,  $\text{m}6$  e  $\text{m}7$  são independentemente selecionados de 0-10,

$\text{m}2$  e  $\text{m}5$  são independentemente selecionados de 0-25,

$\text{n}1$ ,  $\text{n}2$ ,  $\text{n}3$  e  $\text{n}4$  são independentemente selecionados de 0-

16,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> e R<sup>5</sup> são independentemente selecionados de hidrogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-alquila, arila ou hetarila; em que os grupos alquila, arila e hetarila são opcionalmente substituídos com halogênio, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN ou -OH,

E1 e E2 são independentemente selecionados de -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- ou uma ligação de valência; em que R<sup>6</sup> e R<sup>7</sup> representam independentemente hidrogênio ou C<sub>1-6</sub>-alquila,

W<sub>1</sub> a W<sub>5</sub> são independentemente selecionados de -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- ou uma ligação de valência; em que s2 é 0 ou 1.

[000488] A descrição aqui de qualquer aspecto ou modalidade da invenção usando termos tais como "compreendendo", "tendo", "incluindo" ou "contendo" com referência a um elemento ou elementos pretende prover apoio para um aspecto ou modalidade similar da invenção que "consiste em", "consiste essencialmente em" ou "compreende substancialmente" esses elemento ou elementos particulares, a menos que de outro modo declarado ou claramente contradito pelo contexto (por exemplo, uma composição descrita aqui como compreendendo um elemento particular deve ser compreendida também como descrevendo uma composição consistindo neste elemento, a menos que de outro modo declarado ou claramente contradito pelo contexto).

[000489] A presente invenção inclui todas as modificações e equivalentes da matéria objeto mencionada nos aspectos ou reivindicações apresentados aqui até o ponto máximo permitido pela lei aplicável.

[000490] A presente invenção é ainda ilustrada pelos exemplos que seguem que, no entanto, não devem ser considerados como limitantes do escopo de proteção. As características reveladas no relatório acima e nos exemplos que seguem podem, ambos separadamente e em qualquer combinação das mesmas, ser material para realização da invenção em suas diversas formas.

### EXEMPLOS

#### Abreviações:

amu = unidades de massa atômica

CV = volumes de coluna

hr(s) = hora(s)

Hz = hertz

L = litro(s)

M = molar

mbar = millibar

mg = miligrama(s)

min. = minuto(s)

mL = mililitro(s)

mM = millimolar

mm = milímetros(s)

mmol = millimole(s)

nmol = nanomole(s)

mol = mole(s)

μL = microlitros

N = normal

nm = nanometro(s)

sec = segundo(s)

ppm = partes por milhão

ESI = ionização por eletropulverização

i.v. = intravenoso

m/z = razão de massa para carga

MS = espectrometria de massa

HPLC = cromatografia líquida de alta pressão

RP = fase reversa

HPLC-MS = cromatografia líquida de alta pressão –  
espectrometria de massa

NMR = espectroscopia de ressonância magnética nuclear

p.o. = per oral

rt ou RT = temperatura ambiente

s.c. = subcutânea

tr = tempo de retenção

Boc = *terc* butiloxicarbonila

O-*t*-Bu = *terc* butil éster

*t*-Bu = *terc* butila

Boc-4-ABZ-OH = ácido 4-*terc*-butoxicarbonilamino-benzoico

DCM = diclorometano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cloreto de metileno

DIC = diisopropilcarbodiimida

DIPEA = N,N-diisopropiletilamina

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

DTT = ditioneitol

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

Et<sub>2</sub>O = dietil éter

EtOAc = acetato de etila

Fmoc = 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonila

Fmoc-Glu-O-*t*-Bu = 1-*t*-butil éster do ácido N-Fmoc-  
glutâmico

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

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

OEG = (2[2-(amino)etóxi]etóxi)acetila

Fmoc-Thx-OH = ácido N-Fmoc-*trans*-4-aminometilciclohexanocarboxílico

H<sub>2</sub>O = água

HOBt = 1-hidroxibenzotriazol

MeCN = acetonitrila

MeOH = metanol

MTP = 3-metil-tio-1-propanol

NaCl = cloreto de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

NMP = N-metilpirrolidin-2-ona

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

TFA = ácido trifluoracético

THF = tetraidrofurano

TIS = triisopropilsilano

CDCl<sub>3</sub> = deutério cloforórmio

CD<sub>3</sub>OD = tetradeutério metanol

DMSO-*d*<sub>6</sub> = hexadeutério dimetilsulfóxido

TNBS = ácido trinitrobenzenossulfônico

TSTU = tetrafluorborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametil urânio

[000491] Os exemplos também fazem uso dos métodos gerais que seguem:

#### Método geral para preparação de compostos de hGH

[000492] O gene codificando o composto de hormônio do crescimento foi inserido recombinantemente em um vetor de plasmídeo. Uma linhagem de *E. coli* adequada foi subsequentemente transformada usando o vetor de plasmídeo. Variantes de hGH ou GH

podem ser expressos com uma metionina N-terminal ou como uma fusão de MEAE da qual a sequência de MEAE é subsequentemente clivada.

[000493] Estoque de célula foi preparado em glicerol 25% e armazenado a  $-80^{\circ}$  C. Linhagem de estoque de glicerol foi inoculada em placas de LB e subsequentemente incubada a  $37^{\circ}$  C da noite para o dia. O teor de cada placa foi lavado com meio LB e diluído em 500 mL de meio LB para expressão. As culturas foram incubadas a  $37^{\circ}$  C com agitação a 220 rpm até  $OD_{600}$  0,6 ser atingido. Indução continuada foi realizada usando IPTG 0,2 mM a  $25^{\circ}$  C por 6 horas. As células foram finalmente coletadas através de centrifugação.

[000494] As células foram subsequentemente suspensas em Tris-HCl 10 mM, pH = 9,0 contendo Tween 20 0,05%, EDTA 2,5 mM, cisteamina 10 mM e ureia 4M e rompidas usando um aparelho de rompimento de célula a 30kPSI. O sobrenadante foi coletado através de centrifugação e subsequentemente submetido à purificação cromatográfica.

[000495] A purificação foi realizada usando cromatografia de troca de íon e interação hidrofóbica, seguido por remoção do *tag* de peptídeo usando dipeptidil peptidase humana I (hDPPI) expressa a partir de célula CHO. Purificação final foi obtida através de isoprecipitação e cromatografia de troca de íon. A purificação poderia ser também obtida usando, mas não limitado a, cromatografia de troca de íon, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho e técnicas de separação baseadas em membrana conhecidas de um versado na técnica.

#### Caracterização química de proteína de compostos de hormônio do crescimento purificados

[000496] A proteína purificada intacta foi analisada usando MALDI-MS. A massa observada correspondia à massa teórica deduzida da

sequência de aminoácido. As ligações dissulfeto de ligação esperadas podem ser demonstradas através de mapeamento de peptídeo usando digestão com tripsina e AspN seguido por análise MALDI-MS da digestão antes e após redução das ligações dissulfeto com DTT.

Ensaio para medição da taxa de degradação por protease de conjugados de compostos GH e hGH

[000497] O composto de interesse é digerido por uma protease relevante (Tripsina, Quimiotripsina, Pepsina, Elastase, Fator VIIa, Fator Xa, Proteinase K, Carboxi peptidase, DPPIV, Endopeptidase neutra, Granzyme B, Prolina-endopeptidase, Peptidase Staphylococcal I, Termolisina, Trombina, Arg-C proteinase, Asp-N endopeptidase, Caspase 1-10, Clostripaína, Enterocinase, Glutamil endopeptidase, Granzyme B, LysC, LysN, Prolina endopeptidase e peptidase Staphylococcal I ou extratos de tecido) em um tampão apropriado (por exemplo, PBS ou bicarbonato de amônio) a 37° C por até 24 horas. Degradação proteolítica é avaliada através de um ensaio de HPLC.

Digestão proteolítica:

[000498] 100 µL de solução de composto de teste a 1mg/mL em tampão de bicarbonato de amônio são degradados por enzima por até 24 horas a 37° C. Subamostras são obtidas em vários pontos de tempo e a reação proteolítica é parada através da acidificação da amostra através de diluição de 10 vezes em TFA 1%. Essas amostras diluídas são analisadas através de HPLC de fase reversa para estimar o grau de digestão proteolítica.

Método de HPLC:

[000499] 10 µL da solução acima são injetados em uma coluna Vydac C4 de 2x250 mm de fase reversa eluída com um gradiente linear de TFA 0,1% em água para acetonitrila 100% contendo TFA 0,1% durante um período de 30 minutos em uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min. Detecção de picos é realizada em absorção de UV a 214 nm.

A porcentagem (%) de composto intacto no ponto de tempo  $t=T$  é calculada a partir da área de pico no ponto de tempo  $t=T$  ( $A_T$ ) e a área de pico em  $t=0$  ( $A_0$ ) como  $(A_T/A_0) \times 100\%$ . A porcentagem de composto intacto (%) é posta em gráfico contra o tempo usando *software* GraphPad Prims ver. 5.01. A meia-vida ( $T_{1/2}$ ) é calculada como uma queda em fase também pelo *software* GraphPad Prism. Exemplos de enzimas que podem ser usadas são elastase (Sigma da pancrease de porco) e quimiotripsina (grau de sequenciamento Roche). Exemplo de tampão é bicarbonato de amônio 50 mM, pH – 8,5.

#### Eletroforese capilar:

[000500] Eletroforese capilar foi realizada usando um sistema Agilent Technologies 3DCE (Agilent Technologies). Aquisição de dados e processamento de sinal foram realizados usando Agilent Technologies 3DCE ChemStation. O capilar era de 64,5 cm (comprimento eficiente de 56,0 cm) d.i. 50  $\mu\text{m}$ . "Extended Light Path Capillary" da Agilent. Detecção por UV foi realizada a 200 nm (Bw 16 nm, Referência 380 nm e Bw 50 nm). O eletrólito de atividade era tampão de fosfato 50 mM pH 7 (método A). O capilar foi condicionado com NaOH 0,1M por 3 minutos, então com água Milli-Q por 2 minutos e com o eletrólito por 3 minutos. Após cada rodada, o capilar recebeu fluxo de água Milli-Q 2 por 2 minutos, então com ácido fosfórico por 2 minutos e com água milli-Q por 2 minutos. A injeção hidrodinâmica foi feita a 50 mbar por 4,0 segundos. A tensão era +25 kV. A temperatura do capilar era 30° C e o tempo de atividade era 10,5 minutos.

#### Espectrometria de massa Maldi-Tof:

[000501] Pesos moleculares foram determinados usando o instrumento Autoflex Maldi-Tof (Bruker). As amostras foram preparadas usando ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico como matriz.

#### RP-HPLC:

[000502] Análise de RP-HPLC foi realizada em um sistema Agilent

1100 usando uma coluna de sílica de sílica C-18 de 5 µm Vydac 218TP54 4,6 mm x 250 mm (The Separation Group, Hesperia). Detecção foi através de UV a 214 nm, 254 nm, 280 nm e 301 nm. A coluna foi equilibrada com ácido trifluoracético 0,1% / H<sub>2</sub>O e a amostra foi eluída por um gradiente adequado de 0 a 90% de acetonitrila contra ácido trifluoracético 0,1% / H<sub>2</sub>O.

#### LC-MS:

[000503] Análise de LC-MS foi realizada em um espectrômetro de massa PE-Sciex API 100 ou 150 equipado com duas Microbombas Perkin Elmer Series 200, um autoamostrador Perkin Elmer Series 200, um detector de UV Applied Biosystems 785A e um Sedex 75 Evaporative Light scattering detector. Uma coluna de sílica C-18 de 5 µm Waters Xterra 3,0 mm x 50 mm foi eluída a 1,5 ml/min em temperatura ambiente. Ela foi equilibrada com MeCN 5% / TFA 0,1% / H<sub>2</sub>O e eluída por 1,0 minuto com MeCN 5% / TFA 0,1% / H<sub>2</sub>O e então com um gradiente linear para MeCN 90% / TFA 0,1% / H<sub>2</sub>O durante 7 minutos. Detecção foi através de detecção por UV a 214 nm e Evaporative light Scattering. Uma fração do eluato de coluna foi introduzida na interface de pulverização de íon de um espectrômetro de massa PE-Sciex API 100. A faixa de massa de 300-2000 amu foi varrida a cada 2 segundos durante a rodada.

#### Quantificação de proteína:

[000504] As concentrações de proteína foram estimadas através da medição da absorbância a 280 nm usando um espectrofotômetro de UV NanoDrop ND-1000.

[000505] Mapeamento de peptídeo enzimático para determinação de sítio(s) de derivatização:

[000506] Mapeamento de peptídeo foi realizado usando digestão com Asp-N da proteína reduzida e alquilada. Primeiro a proteína foi tratada com DTT e iodoacetamida de acordo com procedimentos

padrão. O produto alquilado foi purificado usando HPLC. Subsequentemente o produto purificado alquilado foi digerido da noite para o dia com endoprotease Asp-N (Boehringer) em uma razão de enzima:substrato de 1:100. A digestão foi separada por HPLC usando uma coluna C-18 e sistema de tampão de TFA/MeCN padrão. O mapa de peptídeo resultante foi comparado com aquele de hGH derivatizado e frações com tempos de retenção diferentes foram coletadas e analisadas mais usando espectrometria de massa Maldi-tof.

#### Página de SDS:

[000507] Eletroforese em SDS gel de poli(acrilamida) foi realizada usando géis NuPAGE 4% - Bis-Tris 12% (Invitrogen NP0321BOX). Os géis foram tingidos com prata (Invitrogen LC6100) ou tingidos com Coomassie (Invitrogen LC6065) e em que relevante também tingidos com relação a PEG com iodeto de bário conforme descrito por M.M. Kurfurst em *Anal. Biochem.* **200**(2), 244-248 (1992).

#### Cromatografia de proteína:

[000508] Cromatografia de proteína foi realizada em um sistema cromatográfico Äkta Explorer e colunas da GE Health Care. Troca de ânion foi feita usando uma coluna Q-Sepharose HP 26/10. Tampão de partida era tampão de trietanolamina 20 mM pH 8,5 e tampão de eluição era tampão de partida + NaCl 0,2M. Os compostos foram tipicamente eluídos com um gradiente de tampão de eluição de 0-75% em volumes de 15 colunas. Retirada de sal e troca de tampão foram realizadas usando uma coluna HiPrep 26/10.

#### Teste de TNBS

[000509] Uma solução de DIPEA 10% em DMF (solução 1) e uma solução de TNBS aquoso 1M (solução 2) foram preparadas. Algumas contas de resina foram postas em um tubo de teste pequeno e 1-3 gotas de cada solução foram adicionadas. Após uma mistura curta a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 10 minutos e as

contas inspeccionadas. Contas intensamente laranjas ou vermelhas indicam resultados positivos (isto é, presença de aminas livres); contas amarelas ou ligeiramente laranjas indicam levemente positivo e contas incolores são negativas.

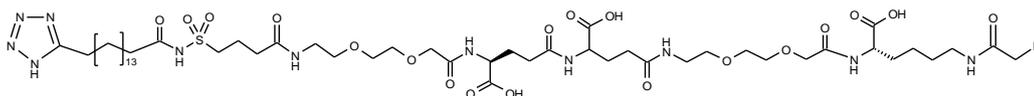
### Cálculo de LogP

[000510] Valores de LogP podem ser calculados como mLogP e/ou cLogP para a parte de ligante de albumina e/ou a parte de espaçador hidrofílico usando algoritmos publicados (*J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant,  $\sigma$ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski e outros. *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**, 976-978, (1994) "Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods". Aqui clogP - Pomona College logP (coeficiente de divisão de octanol/água) é calculado com Sybyl 7.0 da Tripos (<http://www.tripos.com>) versão 4.2 do algoritmo clogP e versão 22 de seu banco de dados de fragmento associado conforme provido pela BioByte Corp (<http://www.biobyte.com/>).

### Preparação de ligantes de albumina

#### Exemplo 1

#### 4-(1H-Tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoil)butanoil-OEG- $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-OEG- $N^{\epsilon}$ (C(O)CH<sub>2</sub>Br)Lys-OH (I):

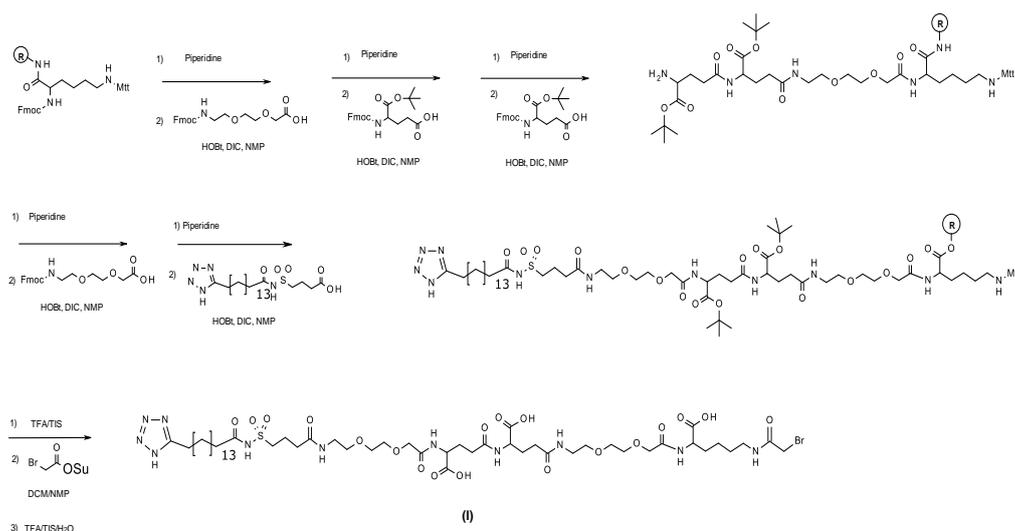


[000511] O composto (I) foi sintetizado em apoio sólido de acordo com o esquema 1, em escala de 1 mM usando química de peptídeo Fmoc padrão em um sintetizador ABI433. O peptídeo foi montado em uma resina Fmoc-Lys(MTT)-Wang usando aminoácidos protegidos

com Fmoc-OEG-OH e Fmoc-Glu-OtBu. Ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butírico foi acoplado manualmente usando DIC/NHS em DCM/NMP, 2 equivalentes da noite para o dia, teste TNBS mostrou que a reação estava completa. A resina foi então tratada com 50 mL de DCM/TFA/TIS/água (94:2:2:2) em uma disposição de fluxo até que a cor amarela desapareceu, ~20 minutos, seguido por lavagem e neutralização com DIPEA/DMF. Ácido bromoacético (4 mM) em DCM/NMP (1:1) foi ativado com uma mistura de 1 mM de NHS e DIC, filtrado e adicionado à resina com adição de mais 1 mM de DIPEA. Após 1 hora a reação estava completa. A resina foi tratada com 80 mL de TFA/TIS/água (95:2,5:2,5) por 1 hora. Evaporada com uma corrente de N<sub>2</sub>, precipitada através da adição de Et<sub>2</sub>O e lavada com Et<sub>2</sub>O e seca. O produto bruto foi purificado em HPLC preparativa (2 rodadas), com um gradiente de 30-80%, TFA 0,1 / MeCN contra TFA 0,1% em água. Frações foram coletadas e liofilizadas com MeCN ~50% dando o composto (I).

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

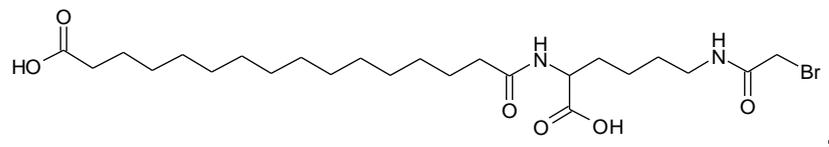
### Esquema 1



### EXEMPLO 2

[000512] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH

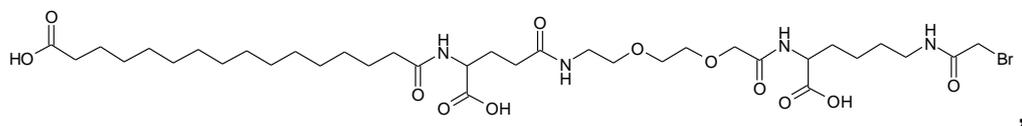
e Resina Wang.



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

### Exemplo 3

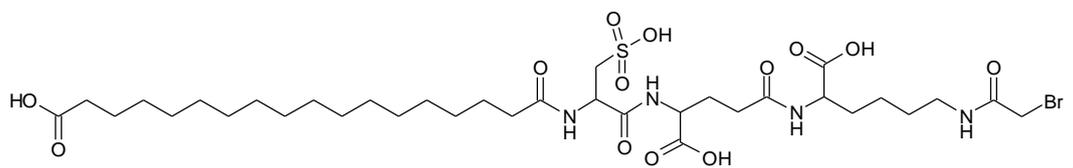
[000513] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 4

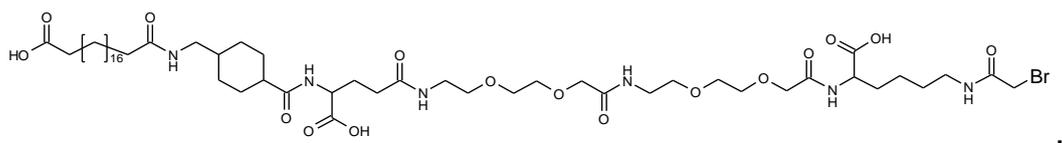
[000514] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 5

[000515] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.

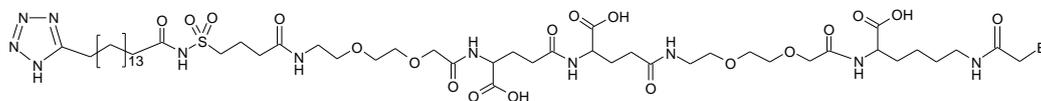


TOF-MS: massa 1151,27 (M+1)

### Exemplo 6

[000516] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima

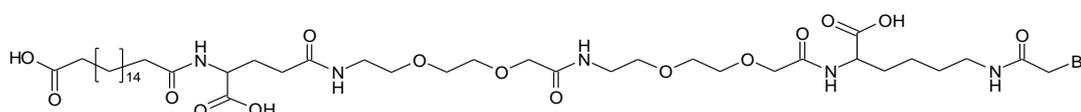
o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 7

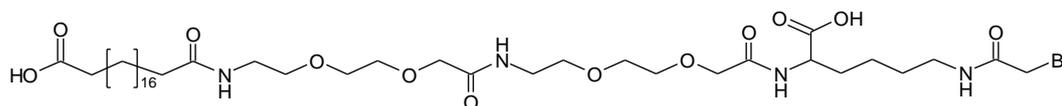
[000517] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 8

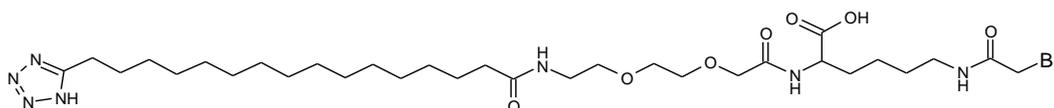
[000518] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 9

[000519] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.

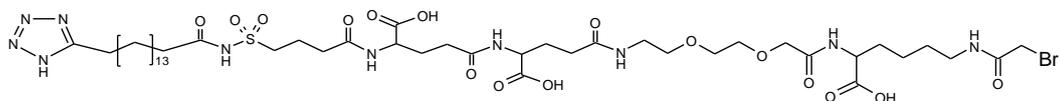


TOF-MS: massa 782,74 (M+1)

### Exemplo 10

[000520] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e

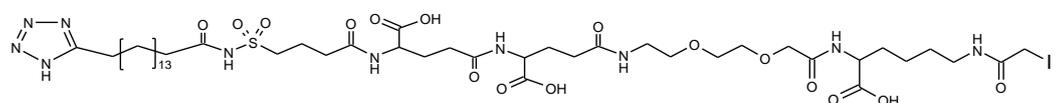
## Resina Wang.



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

Exemplo 11

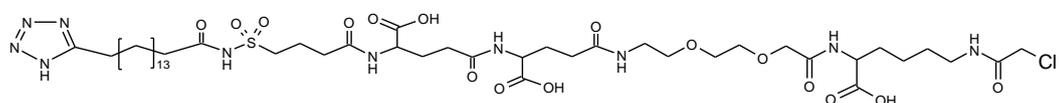
[000521] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH, ácido iodoacético e Resina Wang.



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

Exemplo 12

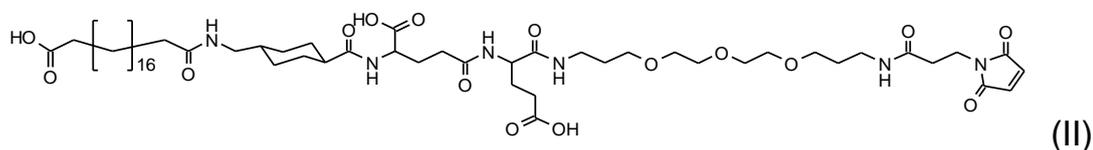
[000522] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 1 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH, ácido cloroacético e Resina Wang.



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

Exemplo 13

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



[000523] Resina de 2-clorotritila (2,0 g, 2,6 mmoles) foi inchada em DMC por 0,5 hora. Uma solução de 4,7,10-trioxa-1,13-diamina em DCM (30 mL) foi adicionada. A resina foi agitada em temperatura ambiente por 1 hora. A resina foi lavada uma vez com DCM, então foi adicionada uma solução de DIPEA:MeOH:DCM (15 mL:15 mL:20 mL). A resina foi agitada por 0,5 hora, então lavada três vezes com DCM.

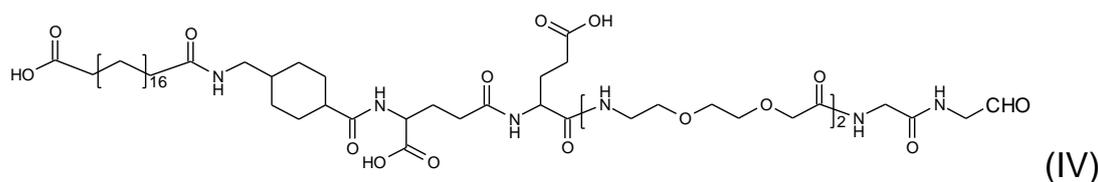
Fmoc-Glu(OtBu)OH, Fmoc-Glu-OtBu e FmocThexOH foram então acoplados sequencialmente através de química de peptídeo padrão como segue: Uma solução de 0,5 M de cada Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt em NMP (11,7 mL) – foi misturada e após 2 minutos adicionada à resina. A resina foi agitada por 45 minutos em temperatura ambiente e então lavada com 5xNMP e 5xDCM. Uma solução de Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/NMP (1:1:5) foi adicionada e a resina foi agitada em temperatura ambiente por 10 minutos. A resina foi lavada (5xNMP e 5xDCM). A resina foi então tratada com piperidina 30% em NMP por 2x10 minutos e finalmente lavada com 5xNMP e 5xDCM. O peptídeo foi então adicionado a uma solução 0,25 M de eicosanodiácido (6 equivalentes) contendo HOAt 0,125M (3 equivalentes), DIC 0,125M (3 equivalentes) e lutidina 0,125M (3 equivalentes). A resina foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas seguindo por lavagem com 5xNMP e 8xDCM. O produto foi clivado da resina usando TFA 10%-DCM por 20 minutos. A resina foi filtrada e tratada mais uma vez com TFA 10%-DCM por mais 20 minutos. Os filtrados combinados foram coletados e evaporados até secagem.

[000524] O produto seco acima foi dissolvido em DMF (6 mL) e adicionado ácido 3-maleimidopropiônico ativado com TSTU (pré-preparado através de reação de TSTU com ácido 3-maleimidopropiônico em DMF (2 mL) por 45 minutos) e DIPEA (200 µL). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 1 hora. A mistura de reação foi evaporada até secagem e o resíduo dissolvido em TFA 95%-água Milli-Q e agitado em temperatura ambiente por 20 minutos. A mistura foi evaporada até secar. Ao resíduo foi adicionado um mínimo de água para precipitar o sólido. O precipitado foi filtrado e recristalizado a partir de MeCN. Os os cristais foram coletados e lavados extensivamente com Et<sub>2</sub>O dando o composto (II) como um sólido branco.

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

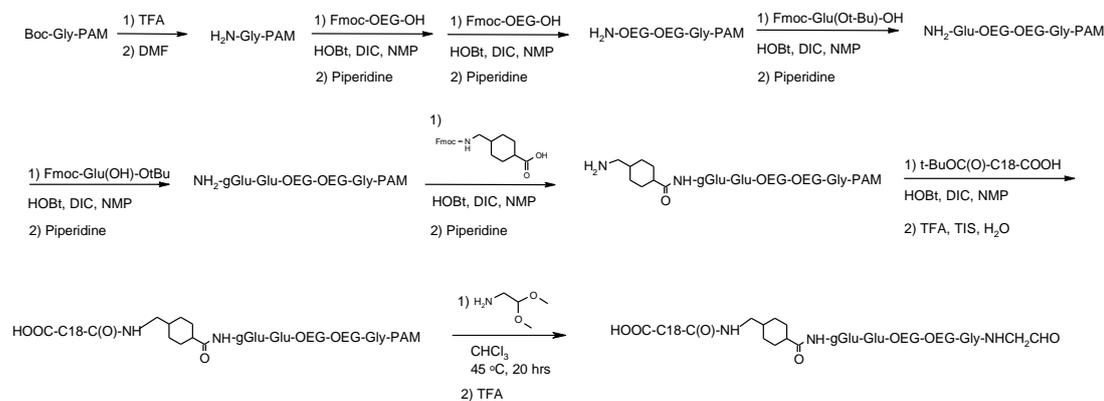
### Exemplo 14

[000525] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 14 acima e mostrado no esquema 2 abaixo o composto que segue foi preparado usando resina de Boc-Gly-PAM como material de partida e ácido mono-*terc*-butil-eicosanoico, ácido 4-Boc-aminobenzoico, aminoácidos protegidos com Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu. Após desproteção leve, o produto de peptídeo foi clivado a partir da resina usando 2,2-dimetoxietilamina seguido por desacetilação usando TFA que forneceu ligante de albumina (IV).



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

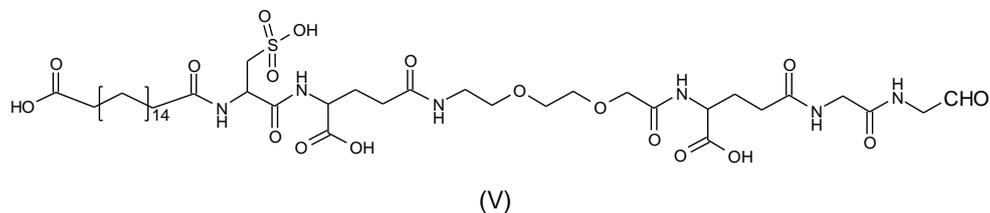
### Esquema 2:



### Exemplo 15

[000526] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 14 acima o composto que segue foi preparado usando resina de Boc-Gly-PAM como material de partida e ácido mono-*terc*-butil-eicosanoico, ácido 4-Boc-aminobenzoico, aminoácidos protegidos com Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu. Após desproteção leve, o produto de peptídeo foi clivado a partir da resina

usando 2,2-dimetoxietilamina seguido por desacetilação usando TFA que forneceu ligante de albumina (V).



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

### Exemplo 16

[000527] De uma maneira simliar àquela descrita no Exemplo 14 acima o composto (VI) foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-resina Wang como material de partida e ácido mono-terc-butil-octadecanodioico, aminoácidos protegidos com Boc-Ser(t-Bu)-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH e Fmoc-Cys-OH oxidado. O produto de peptídeo foi clivado a partir da resina usando TIS 2,5%, H<sub>2</sub>O 2,5% em THF por 3 horas e purificado através de HPLC preparativa:

Coluna: C18 2 cm

Eluente A: TFA 0,1% Água Milli-Q

Eluente B: TFA 0,1% i MeCN

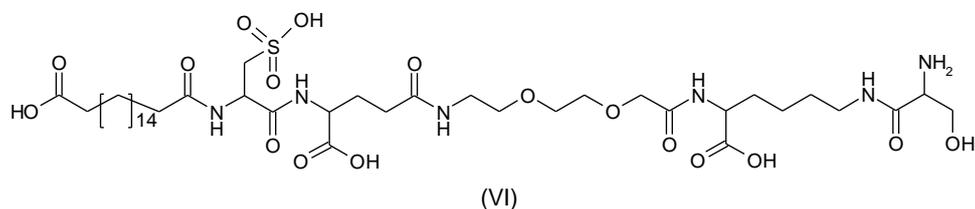
% de B inicial: 40%

% de B final: 75%

Gradiente: 5 minutos com MeCN 10%, 5-10 minutos até % de B inicial durante 51 minutos, 5 minutos com % de B final + MeCN 10% aproximadamente 1 hora

[000528] As frações foram analisadas através de LC-MS-TOF.

[000529] As frações desejadas foram coletadas, agrupadas e liofilizadas dando o composto (VI)



(VI)

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

Oxidação de (VI):

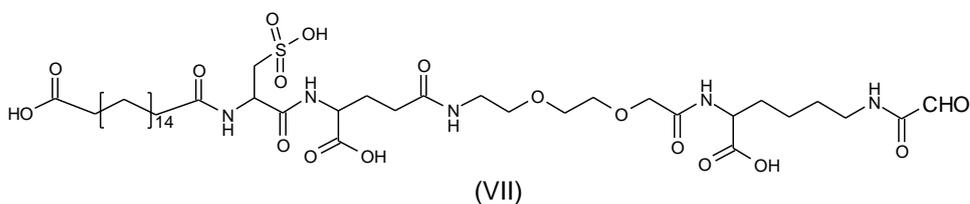
Solução de MTP:

3-Metil-tio-1-propanol (290 mg) dissolvido em 4 mL de HEPES 25 mM , pH 7,00

Solução de periodato:

96 mg de NaIO<sub>4</sub> dissolvidos em 2 mL de água Milli-Q

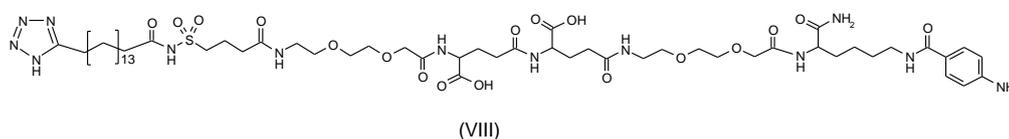
[000530] A uma solução composto (VI) em água Milli-Q (1 mL) foram adicionadas solução de MTP (3,6 mL) + solução de periodato (560 µL) e o pH foi ajustado para 9,5 com uma gota de NaOH 1N. O frasco de reação foi coberto com folha de estanho e agitado por 1 hora em temperatura ambiente. Uma porção adicional de solução de periodato (560 µL) foi adicionada e a mistura de reação foi deixada por 4,5 horas em temperatura ambiente. A mistura resultante foi passada por duas colunas de NAP, para ficar livre de NaIO<sub>4</sub>. As colunas foram pré-lavadas com HEPES 25 mM (5 x 2,5 mL) pH = 7,0. A amostra (2,5 mL) foi aplicada em cada coluna e eluída com 3,5 mL de HEPES 25 mM, pH = 7,0. 2 x 3,5 mL foram agrupados em total de – 10,5 mL conteúdo cetó-aldeído (VII) que foram usados diretamente para conjugação com um análogo de GH.



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

Exemplo 17

4-(1H-Tetrazol-16-il-hexadecanoilsulfamoil)butanoil-OEG-γGlu-γGlu-OEG-N<sup>ε</sup>(4-aminobenoil)Lys-NH<sub>2</sub> (VIII):



[000531] O composto (VIII) foi sintetizado em apoio sólido de acordo com o esquema 3. Resina-Rink-Amida protegida com Fmoc (2,2 g, 0,6 mMol/g) foi pesada em um frasco. A resina foi inchada com NMP (3 x 30 mL) por 2 horas. A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (30 mL) por 10 minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (30 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 30 mL). Fmoc-Lys(Mtt)-OH e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromofenol em NMP (30 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada acima seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 21 horas. A resina foi seca e lavada com NMP (6 x 30 mL) seguido por lavagem com DCM (3 x 30 mL). A resina foi tratada com hexafluorisopropanol (20 mL) por 10 minutos. Agitação por 10 minutos. A resina foi drenada e lavada com DCM (3 x 30 mL). A resina foi tratada com hexafluorisopropanol (20 mL) por 10 minutos novamente e agitada por 10 minutos. A resina foi drenada e lavada com DCM (3 x 30 mL) seguido por drenagem e lavagem com NMP (3 x 30 mL). Ácido 4-(Boc-amino)benzoico e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromo fenol em NMP (30 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada acima seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente. A resina foi seca e lavada com NMP (6 x 30 mL). A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 10 minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 15 mL). Fmoc-OEG-OH e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromo fenol em NMP (15 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 23 horas. A resina foi drenada e lavada com NMP (6 x 15 mL). A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 10

minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 15 mL). Fmoc-Glu-O-t-Bu e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromo fenol em NMP (15 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 18 horas. A resina foi drenada e lavada com NMP (6 x 15 mL). A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 10 minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 15 mL). Fmoc-Glu-O-t-Bu e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em 15 ml de azul de bromo fenol 0,5 mM em NMP. Esta solução foi adicionada à resina drenada seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 18 horas. A resina foi drenada e lavada com NMP (6 x 15 mL). A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 10 minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 15 mL). Fmoc-OEG-OH e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromo fenol em NMP (15 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente. A resina foi drenada e lavada com NMP (6 x 15 mL). A resina foi agitada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 10 minutos. A resina foi drenada e tratada com piperidina 25% em NMP (10 mL) por 1 hora seguido por drenagem e lavagem com NMP (6 x 15 mL).

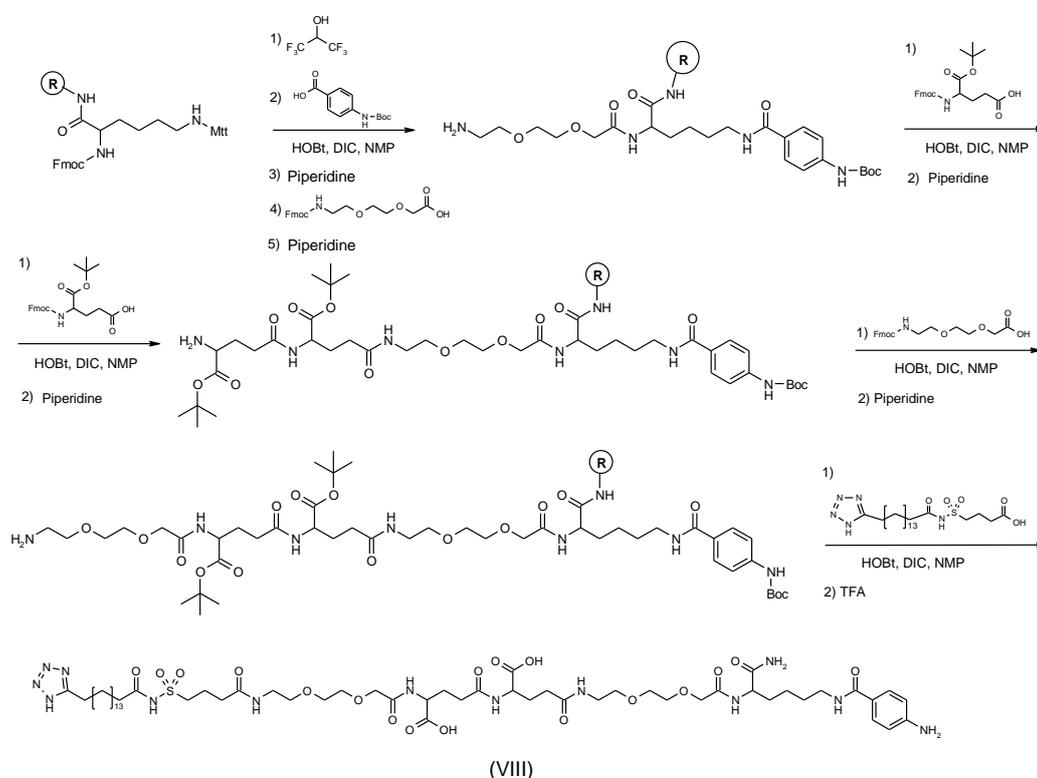
[000532] Ácido 4-(16-1H-tetrazol-5-il-hexadecanoilsulfamoil)butírico e HOBt foram pesados em um frasco, dissolvidos em azul de bromo fenol em NMP (15 mL, 0,5 mM). Esta solução foi adicionada à resina drenada seguido pela adição de DIC. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 21 horas. A resina foi drenada e lavada com

NMP (6 x 15 mL) seguido por drenagem e lavagem com DCM (6 x 15 mL). A resina foi clivada com uma msitura de TFA 95% em água (10 mL) + DCM (0,25 mL) e TIS (0,25 mL). A resina foi agitada por 2 horas em temperatura ambiente e filtrada em Et<sub>2</sub>O gelado (75 mL). O precipitado resultante foi isolado através de centrifugação seguido por lavagem com Et<sub>2</sub>O (3x) e seco a vácuo por 48 horas dando o 300 mg de composto bruto (VIII).

[000533] O composto (VIII) bruto foi purificado em HPL preparativa (GILSON), MeCN 30->80%. As frações agrupadas foram evaporadas até secar e o resíduo dissolvido em H<sub>2</sub>O/MeCN 1:1 e seco por congelamento da noite para o dia fornecendo 170 mg do composto (VIII).

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

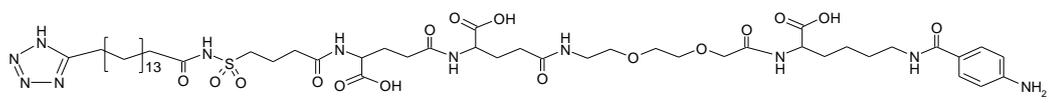
### Esquema 3



### Exemplo 18

[000534] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH

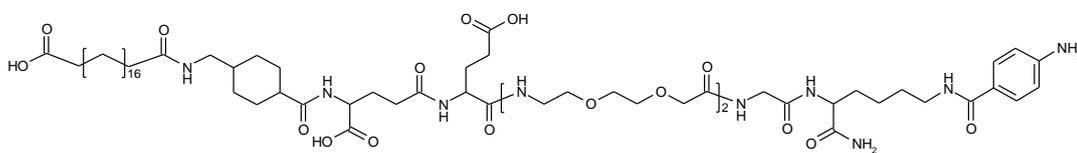
e Resina Wang.



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

### Exemplo 19

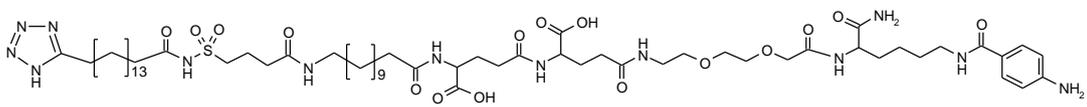
[000535] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 20

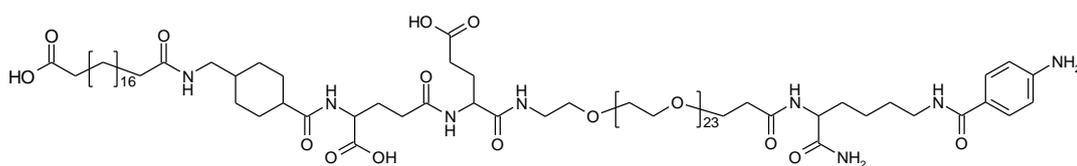
[000536] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 21

[000537] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.

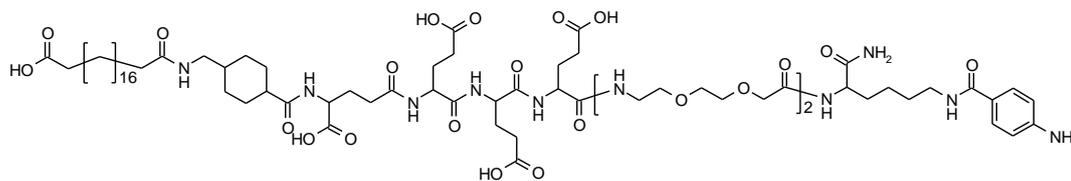


TOF-MS: massa 2114,64 (M+1)

### Exemplo 22

[000538] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH

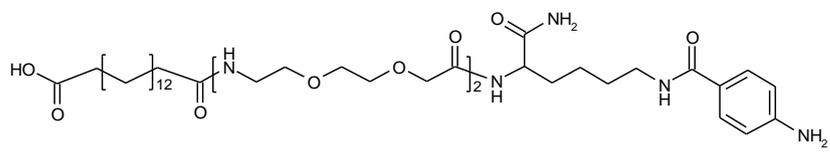
e resina Rink amida.



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

### Exemplo 23

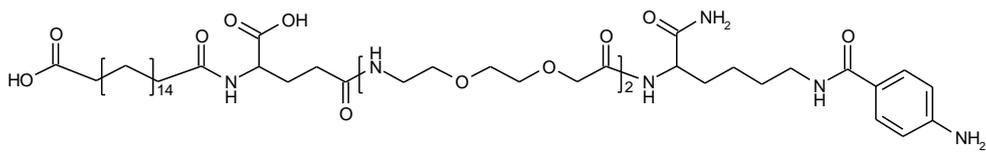
[000539] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



TOF-MS: massa 823,05 (M+1)

### Exemplo 24

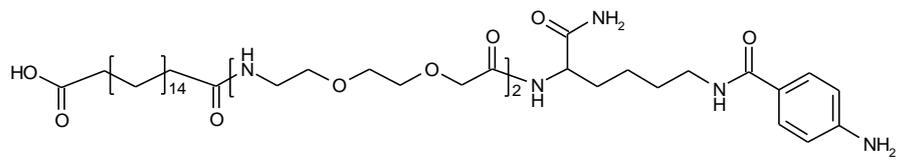
[000540] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 25

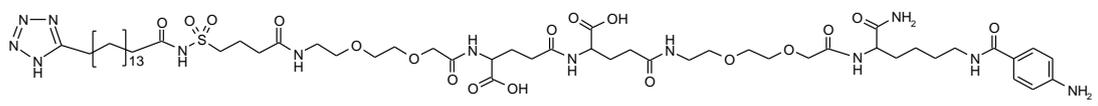
[000541] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 26

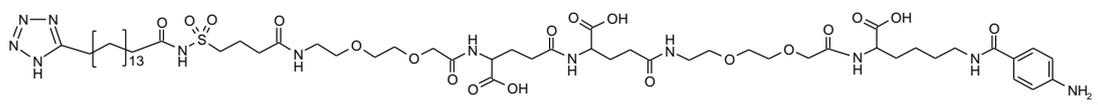
[000542] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 27

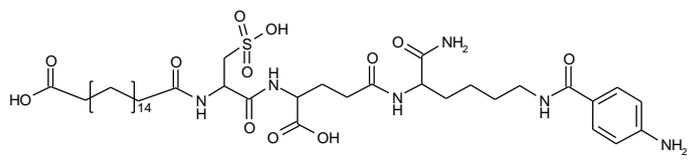
[000543] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e Resina Wang.



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

### Exemplo 28

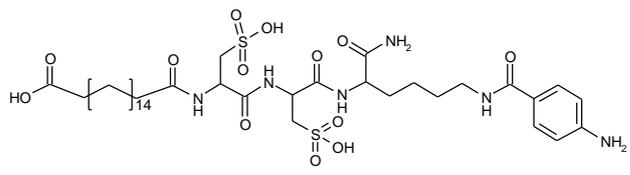
[000544] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 29

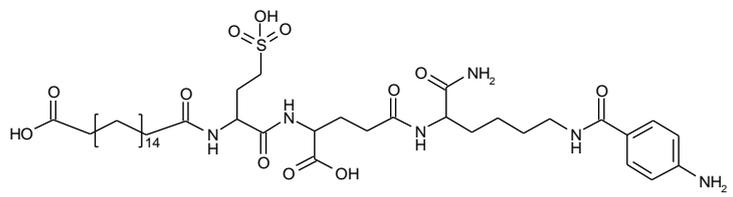
[000545] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 30

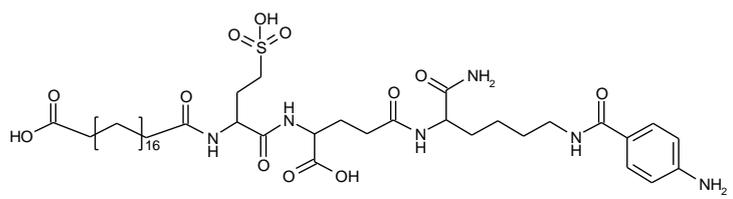
[000546] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 31

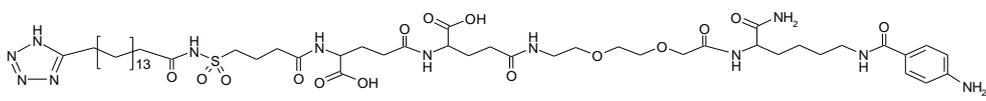
[000547] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 32

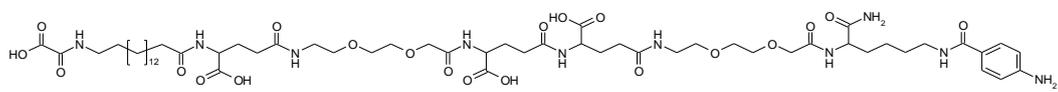
[000548] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

### Exemplo 33

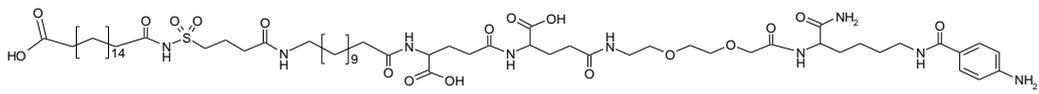
[000549] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

Exemplo 34

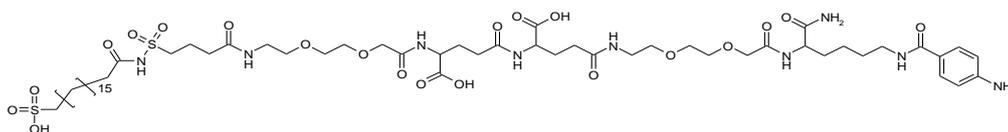
[000550] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

Exemplo 35

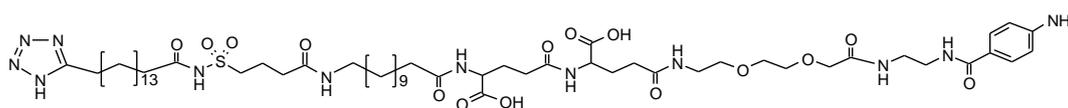
[000551] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina Rink amida.



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

Exemplo 36

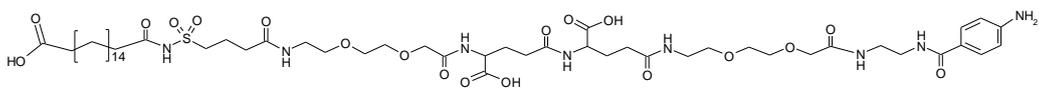
[000552] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Glu(ODmab)-OH e resina de cloreto de 2-clorotritila.



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

Exemplo 37

[000553] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Glu(ODmab)-OH e resina de cloreto de 2-clorotritila.

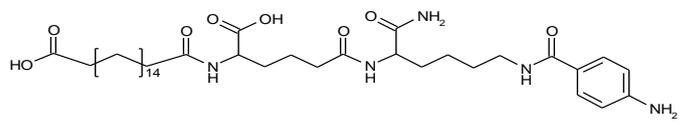


TOF-MS: massa 1173,40 (M+1)

Exemplo 38

[000554] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17

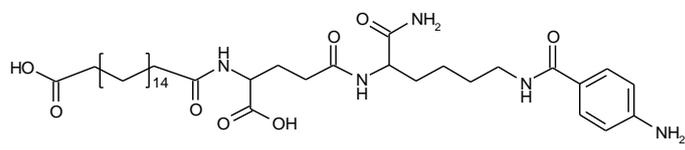
acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina de Rink amida.



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

### Exemplo 39

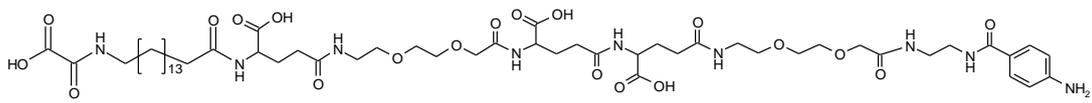
[000555] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Lys(Mtt)-OH e resina de Rink amida.



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

### Exemplo 40

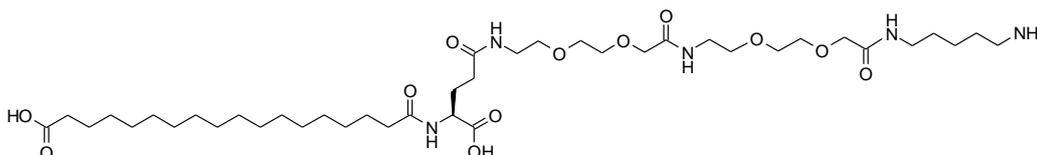
[000556] De uma maneira similar àquela descrita no Exemplo 17 acima o composto que segue foi preparado usando Fmoc-Glu(ODmab)-OH e resina de cloreto de 2-clorotritila.



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

### Exemplo 41

Ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-aminopentilcarbamoil)metóxi]etoxi}etilcarbamoi)-metóxi]etoxi}etilcarbamoil)-1-carboxi-propilcarbamoil]-heptadecanoico:



[000557] N-terc-butoxicarbonil cadaverina (24,3 g, 0,12 mmol) foi adicionada a uma solução de ácido 17-((S)-1-Carboxi-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonilmetóxi)-

etóxi]etilcarbamoil}metóxi)etóxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)-heptadecanoico (100 mg; 0,12 mmol) e DIPEA (46,68 mg; 0,36 mmol) em THF (2,0 ml). A mistura de reação foi agitada da noite para o dia em temperatura ambiente e então concentrada *in vacuo*. O resíduo foi dissolvido em uma mistura de água (5 ml) e THF (2 ml) e purificado através de HPLC preparativa (coluna RP18). Frações contendo o produto de acoplamento Boc protegido foram agrupadas e levadas para secagem. O resíduo foi dissolvido em TFA 50%-DCM (4 ml) e agitado por 1 hora em temperatura ambiente, então concentrado *in vacuo* para prover 54 mg (55%) do material título como seu sal do ácido trifluoracético.

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

#### Preparação de compostos de ligação à albumina de GH:

##### Exemplo 42

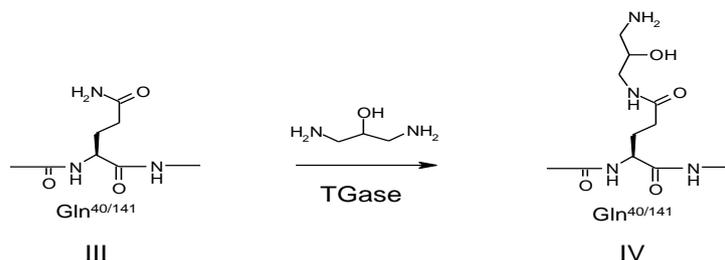
[000558] O uso de uma transglutaminase para ligar uma alça a GH foi anteriormente descrito no WO2005/070468 e pode ser usado de acordo com a presente invenção para a ligação de um ligante de albumina. A TGase usada é transglutaminase microbiana de *Streptovercillium mobaraense* de acordo com US5156956. Um método geral é descrito na seção Química I acima.

1. Acoplamento de composto de GH transaminado e oxidado (I) com um ligante de albumina (II)

[000559] A solução que segue foi preparada:

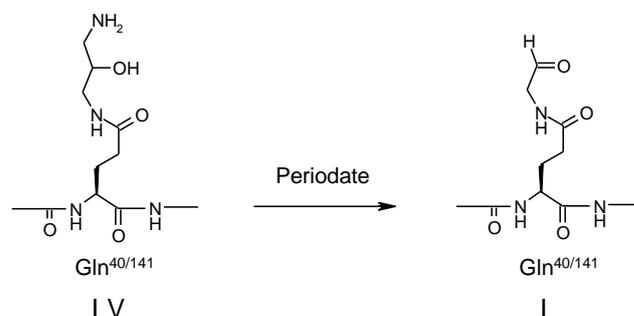
Tampão A: Trietanolamina (119 mg, 0,8 mmol) foi dissolvida em água (40 mL) e o pH ajustado para 8,5.

(A) Transaminação de hGH (III) com 1,3-diamino-2-propanol



[000560] Na etapa seguinte, GH transaminado (III) é adicionado periodato. A oxidação é tipicamente feita em temperatura baixa, tal como 4-10° C durante 30 minutos opcionalmente no escuro. Periodato pode oxidar resíduos de metionina em GH nos seus resíduos de sulfóxido de metionina correspondentes. Para minimizar seu risco de oxidação, tioéteres orgânicos de molécula pequena podem ser adicionados durante oxidação do periodato. Um tioéter orgânico adequado é 3-metiltioprop-1-ol, mas o versado na técnica será capaz de sugerir outros.

Oxidação do composto GH transaminado (IV):



[000561] Troca de tampão pode ser realizada a fim de obter uma solução ácida requerida para redução eficiente de ciano boroidreto de sódio. Tipicamente, um excesso de A-W-B1-NH<sub>2</sub> amina é usado, e cianoboroidreto de sódio pode ser adicionado em porções menores com o tempo.

[000562] As soluções que seguem foram preparadas:

Tampão A: Trietanolamina (119 mg, 0,8 mmol) foi dissolvida em água (40 mL) e o pH ajustado para 8,5.

Tampão B: 3-metiltioprop-1-ol (725 mg, 7,1 mmoles) foi dissolvido em Tampão A (10 mL).

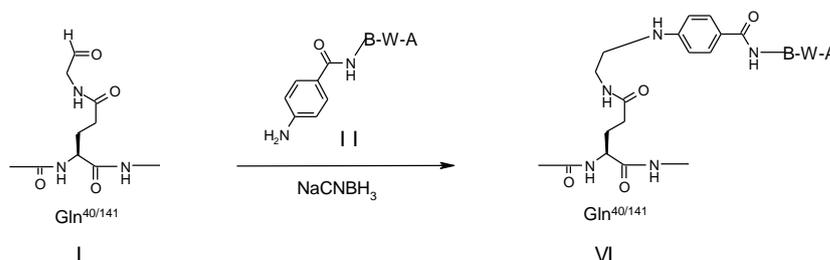
Tampão C: HEPES (5,96 g) foi dissolvido em água (1,0 L) e o pH ajustado para 7,0

Periodato: NaIO<sub>4</sub> (48,1 mg, 0,225 mmol) foi dissolvido em água (1,0 mL)

[000563] A uma solução de (IV) (10 mg, 0,5 µL) foi adicionado

Tampão B (0,2 mL) seguido pela solução de periodato (0,03 mL). Após 20 minutos de incubação a frio a mistura é dialisada 4 vezes com Tampão C. O resíduo é concentrado para 1 mL.

(C) Aminoação redutiva de (I) com ligante de albumina (II)



[000564] Ligante de albumina (II) conforme descrito no Exemplo 17 até o Exemplo 40 pode ser usado.

[000565] A solução final de (B) (1 mL, 10 mg, 0,45  $\mu$ mol (I)) foi misturada com uma solução de ligante de albumina (II) (2 mL, 10 mg, 0,3  $\mu$ mol) em tampão HEPES 25 mM pH 7,0 e a mistura resultante foi lentamente girada em temperatura ambiente por 1 hora. Após 1 hora NaCNBH<sub>3</sub> (100  $\mu$ L de uma solução de NaCNBH<sub>3</sub> (20 mg) em água (0,5 mL) foi adicionado em porções. A mistura é mantida em temperatura ambiente no escuro por 18-24 horas.

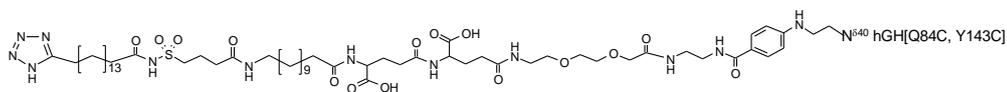
A última reação pode ser realizada como segue:

[000566] Uma solução de GH transaminado oxidado é adicionada a uma solução de ligante de ligação à albumina em uma mistura de AcOH (1,5 mL) e MES 50 mM (0,5 mL) em pH 6,00. A mistura de reação resultante é suavemente agitada em temperatura ambiente por 30 minutos, momento quando uma solução de NaCNBH<sub>3</sub> (15  $\mu$ L (22 mg de solução de NaCNBH<sub>3</sub> dissolvidos em 500  $\mu$ L de água Milli-Q + AcOH (15  $\mu$ L)) é adicionada. A amostra é coberta com folha de estanho e agitada da noite para o dia em temperatura ambiente.

[000567] O conjugado pode ser isolado através de uma cromatografia de troca de ânion como segue: Ácido acético é removido através de troca de tampão com água pura (3X) usando dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) através de centrifugação a 4000

rpm/min por 3 x 8 minutos. A mistura tem então tampão trocado para TEA 20 mM, pH: 8,50 usando dispositivos Amicon Filter e diluída para um volume final de 50 mL com TEA 20 mM, antes do seu carregamento em uma coluna 26/10, HiLoad Q Sepharose. A coluna é inicialmente lavada com TEA 20 mM, pH 8,5 (tampão A) e então eluída com TEA 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,50 (tampão B) usando um gradiente de 0-100% (B) em 20 CV, com uma taxa de fluxo de 2 mL/min. As frações agrupadas tiveram tampão trocado 5 vezes para tampão de bicarbonato de amônio 10 mM em água pura usando dispositivos Amicon Ultra15 (tubos Ultracel 10K) através de centrifugação a 4000 rpm/min por 3 x 8 minutos.

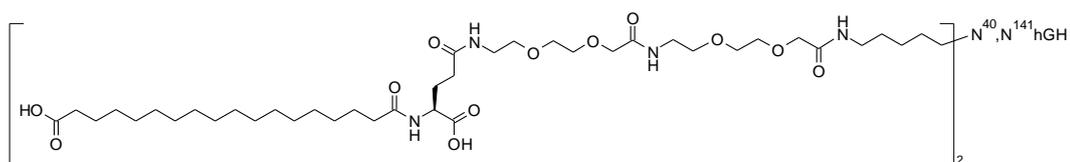
[000568] Uso do ligante de albumina do Exemplo 18 vai resultar no composto que segue 42.1



TOF-MS: massa 23301,63

[000569] O composto que segue foi preparado usando o ligante de albumina do Exemplo 41

42.2



TOF-MS: massa 23727,6245

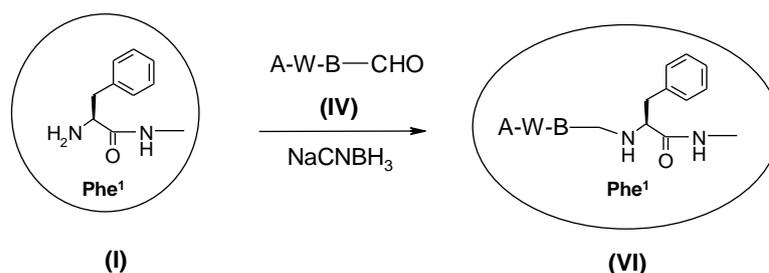
[000570] A uma solução de hGH (1 mg, 45 nmol) e ácido 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-aminopentilcarbamoil)metóxi]etoxi}etilcarbamoil)metóxi]etoxi}etilcarbamoil)-1-carboxi-propilcarbamoil]heptadecanoico (2,10 mg; 2250 nmol) em trietanolamina 20 mM (1000 ul; pH 8,5) foi adicionada TGase (0,12 nmol; *Streptoverticillium mobaraense*). A mistura de reação foi incubada a 25° C por 146 horas, com o que análogo de hGH duplo

derivatizado da fórmula acima foi obtido.

### Exemplo 43

1. Acoplamento de um composto GH (I) N-terminalmente com um ligante de albumina (IV)

(A) Alquilação redutiva de (I) com um aldeído de ligante de albumina (IV)

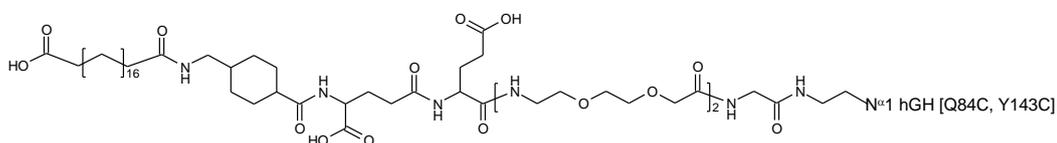


[000571] O processo de derivatização conforme mostrado acima utiliza um ligante de ligação à albumina A-W-B em que B tem uma funcionalidade aldeído terminal. Conjugação de hGH com A-W-B-CHO ocorre através de alquilação redutiva (hGH → VI). Alquilação redutiva é exemplificada aqui e é bem reconhecida na técnica e resulta em compostos hGH modificados na posição N-terminal.

Ligante de albumina (IV) foi obtido conforme descrito no Exemplo 14.

Síntese de 2-(C<sub>20</sub>diácido-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Glicino amida)-etil-N<sup>α</sup>1-hGH [Q84C, Y143C]

#### 43.0



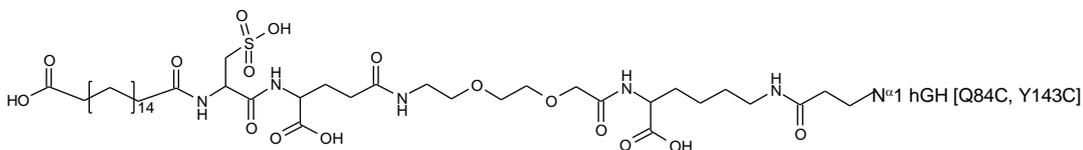
[000572] hGH[Q84C, Y143C] (23 mg) foi dissolvido em tampão de HEPES (2,3 mL 0,25 mM pH 7,0). C<sub>20</sub>diácido-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-dimetilacetal (2 mg, vide Exemplo 14 acima) foi tratado com TFA (50 μL) por 60 minutos e evaporado até secagem a vácuo. O resíduo foi retirado com EtOH (200 μL) e evaporado até secar a vácuo. O resíduo foi dissolvido em DMF (100 μL) e adicionado à solução de

hGH. Um precipitado foi formado e redissolvido através da adição de DMF (1 mL). Após 1 hora uma solução de NaCNBH<sub>3</sub> (20 mg, em 0,5 mL de MeCN (230 µL)) foi adicionada em porções e deixada por 20 horas. A reação foi extinta através da adição de AcOH (2 mL) e diluída com água para um volume total de 20 mL e purificada em HLC preparativa em uma coluna C18 com um gradiente de TFA 0,1% em MeCN de 40-80% contra TFA 0,1% em água. O último pico de eluição foi coletado, diluído de a partir de MeCN 70% a 10% com água e liofilizado dando 4,51 mg de 2-(C<sub>20</sub>diácido-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Glicino amida)-etil-N<sup>1</sup>-hGH [Q84C, Y143C].

TOF-MS: Rt = 15,25 min, massa = 23150

[000573] De uma maneira similar àquela descrita acima o composto que segue foi preparado usando ligante de albumina do Exemplo 16.

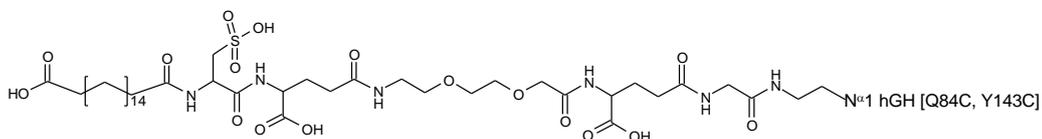
#### 43.1



TOF-MS: Rt = 15,2 min, massa = 23033

[000574] De uma maneira similar àquela descrita acima o composto que segue foi preparado usando ligante de albumina do Exemplo 15.

#### 43.2



TOF-MS: Rt = 15 min, massa = 22989,1

### Exemplo 44

1. Acoplamento de um composto de GH (VII) tendo uma cys única livre interna com um ligante de albumina (VIII)

1) Liberação do GH de Cys livre (VII) através da redução de dissulfeto (VI) com um agente de redução seletivo adequado



em temperatura ambiente por mais 16 horas.

Purificação:

Tampões usados:

Tampão A:

Trietanolamina 20 mM (TEA) + Etileno glicol 10%

5,96 g de trietanolamina

200 mL de etileno glicol

Água MQ adicionada a 2L

pH ajustado para 8,5 com HCl 1N

Tampão B:

Trietanolamina 20 mM (TEA) + NaCl 1,0M + Etileno glicol 10%

5,96 g de trietanolamina

116,88 g de NaCl

200 mL de etileno glicol

Água MQ adicionada a 2L

pH ajustado para 8,5 com HCl 1N

[000577] O tampão de reação foi mudado para tampão de TEA A com etileno glicol em uma coluna Sephadex em 3 rodadas:

Coluna: Sephadex 50/30 G25 fine

Tampão A:

Fluxo: 10 mL/min

Temp: RT (frações coletadas a 12° C)

Frações: 30 mL por fração

[000578] As frações foram coletadas, agrupadas e então purificadas em uma coluna Sepharose Q:

Coluna: Sepharose Q 26/10 HP

Tampão A:

Tampão B:

Gradiente 1: Tampão B 0-10% em 1 CV

Gradiente 2: Tampão B 10-40% em 20 CV

Gradiente 3: Tampão B 40-100% em 1 CV

Fluxo: 8 mL/min

Temp: RT (frações coletadas em RT)

Frações: 5 mL por fração

[000579] Frações desejadas foram coletadas, agrupadas e tampão trocado para bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0 em uma coluna Sephadex G25:

Coluna: Sephadex 50/30 G25 fine

Tampão A: Bicarbonato de amônio 10 mM pH 8,0

Fluxo: 10 mL/min

Temp: RT (frações coletadas a 12° C)

Frações: 30 mL por fração

[000580] Cinco frações foram agrupadas e secas por congelamento.

[000581] O grupo foi analisado através de MS e quantidades grandes de dímero (MS 44491.7) foram vistas.

[000582] Os frascos secos por congelamento foram dissolvidos em tampão A e purificados novamente em uma coluna Sepharose Q nova.

Coluna: Sepharose Q 26/10 HP

Tampão A:

Tampão B:

Gradiente 1: Tampão B 0-10% em 1 CV

Gradiente 2: Tampão B 10-40% em 20 CV

Gradiente 3: Tampão B 40-100% em 1 CV

Fluxo: 8 mL/min

Temp: RT (fração coletada em RT)

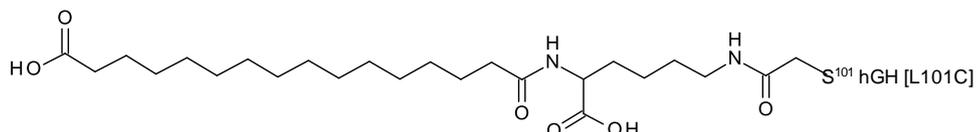
Frações: 5 mL por fração

[000583] As frações foram agrupadas e dessalinizadas/tampão trocado para bicarbonato de amônio 10 mM através de ultrafiltração. O grupo foi concentrado para 25 mL e quantificado através de RP-HPLC e MS-TOF:

TOF-MS: Rt = 16,5 min, massa = 23315,96

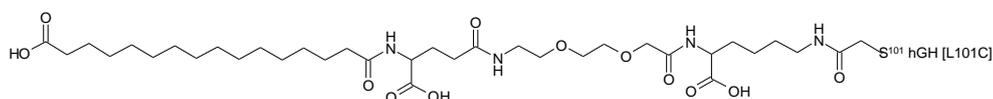
[000584] Os compostos que seguem foram preparados usando o mesmo método.

44.2



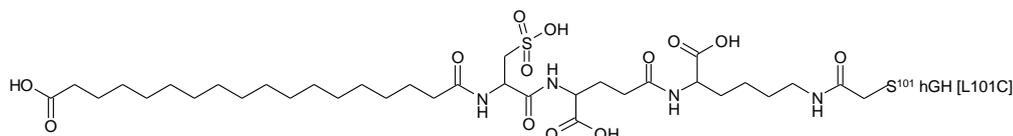
TOF-MS: Rt = 15,24 min, massa = 22676,8

44.3



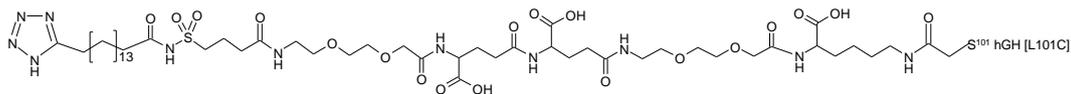
TOF-MS: Rt = 10,5 min, massa = 22975,1

44.4



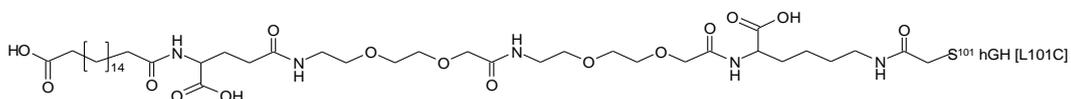
TOF-MS: Rt = 15,5 min, massa = 23009

44.5



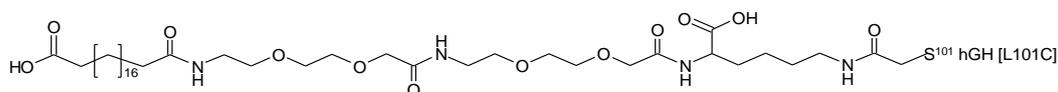
TOF-MS: Rt = 14,0 min, massa = 23305,5

44.6



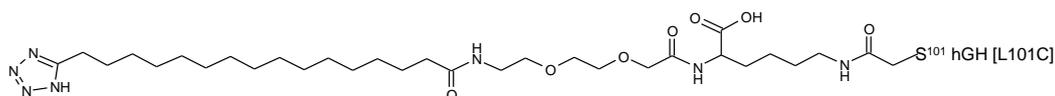
TOF-MS: Rt = 15,27 min, massa = 23148

44.7



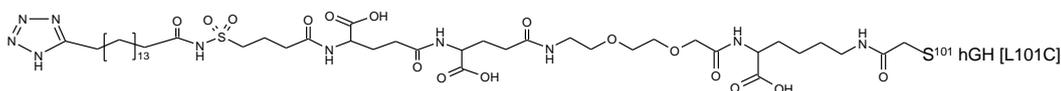
TOF-MS: Rt = 16,40 min, massa = 23048

44.8



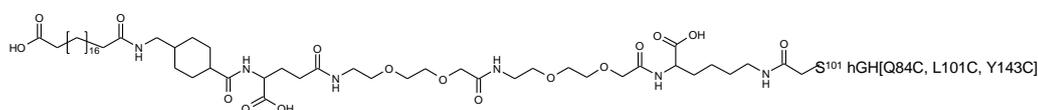
TOF-MS: Rt = 15,3 min, massa = 22884,4

44.9



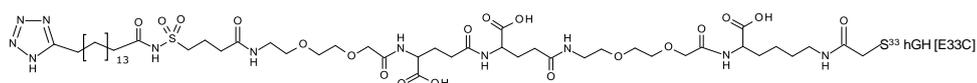
TOF-MS: Rt = 14,6 min, massa = 23291,4

44.10



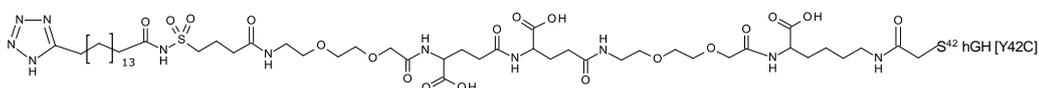
TOF-MS: Rt = 15,05 min, massa = 23097,76

44.11



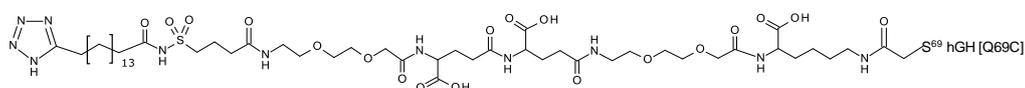
TOF-MS: Rt = 14,2 min, massa = 23420,83

44.12



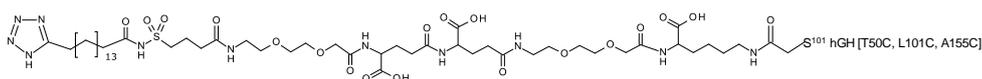
TOF-MS: Rt = 15,7 min, massa = 23289,6

44.13



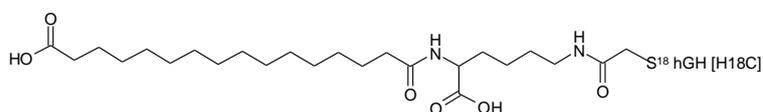
TOF-MS: Rt = 17,0 min, massa = 23324,55

44.15



TOF-MS: Rt = 12,85 min, massa = 23337,5

44.16

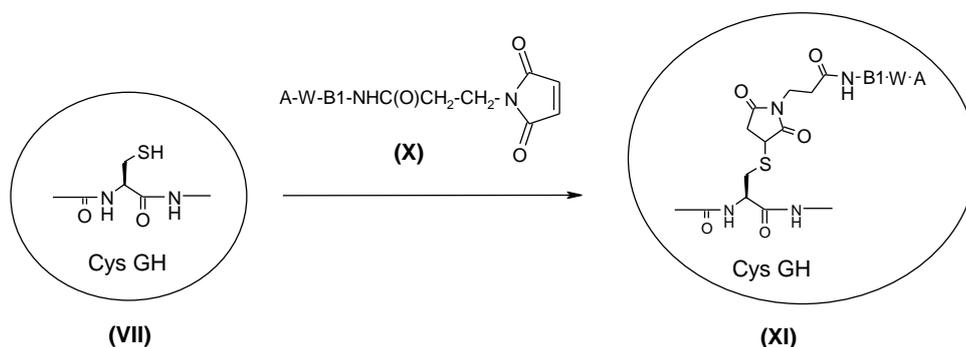


TOF-MS: Rt = 15,24 min, massa = 22676,8

#### Exemplo 45

1. Acoplamento de um composto de GH (VII) tendo uma cys única livre interna com um ligante de albumina (X)

1) Alquilação de GH de Cys livre (VII) com um ligante de albumina substituído com maleimida (X) fornecendo composto de GH conjugado à Cy (XI)



[000585] Composto de GH de Cys desprotegida (VII) conforme obtido acima no Exemplo 44 pode ser reagido com um ligante de ligação à albumina substituído com maleimida (X) fornecendo A-W-B1-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-pirrolidin-2,5-diona-3-hGH (XI) conjugado a GH em que B1 é definido conforme descrito em Química IV acima.

#### Conjugação de Ligante de Albumina Funcionalizado com Maleimida (X) a hGH L101C

##### Etapa (a) desbloqueio de resíduo cisteína

[000586] hGH de Cys bloqueado com glutathiona/cisteamina (VI) foi enzimaticamente desbloqueado usando glutarredoxina II (Grx2) em um tampão de equilíbrio contendo GSH e GSSG. hGH de Cys desbloqueado (VII) foi separado de GSH/GSSG molecular baixo através de troca de tampão em uma coluna Sephadex G25.

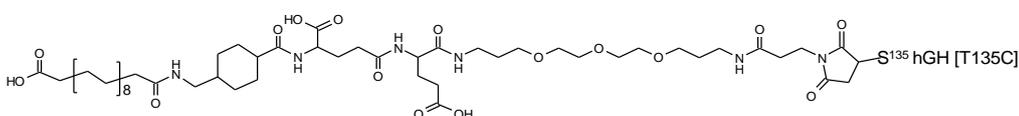
##### Etapa (b) acoplamento a ligante de albumina funcionalizado com maleimida (X)

[000587] Ligante de albumina funcionalizado com maleimida (X) foi dissolvido em tampão contendo hidroxipropil-β-ciclodextrina 5%. A

solução foi então adicionada a hGH de Cys desbloqueado (VII) e deixada reagir da noite para o dia em temperatura ambiente.

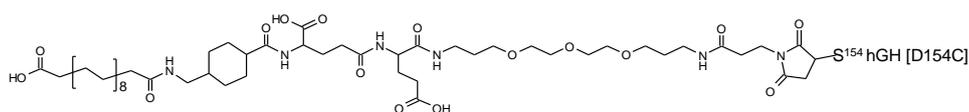
[000588] Após conjugação a proteína conjugada foi purificada em coluna Q Sepharose HiLoad em tampão de trietanolamina 20 mM contendo etileno glicol 10% em pH 8,5 usando um gradiente de cloreto de sódio. As frações coletadas foram agrupadas e transferidas para bicarbonato de amônio 10 mM usando uma coluna G25 e liofilizadas.

## 45.1



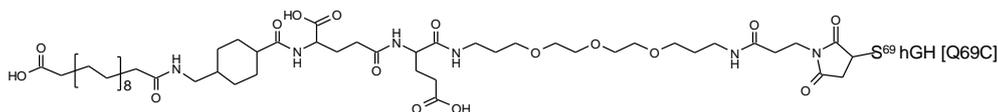
TOF-MS: Rt = 16,0 min, massa = 23352

## 45.2



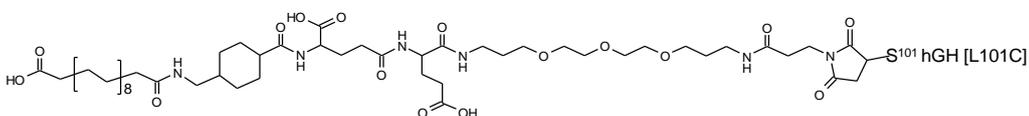
TOF-MS: Rt = 15,98 min, massa = 23338

## 45.3



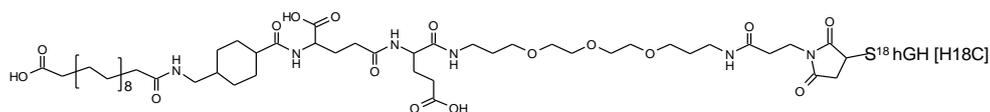
TOF-MS: Rt = 16,62 min, massa = 23324,6

## 45.4



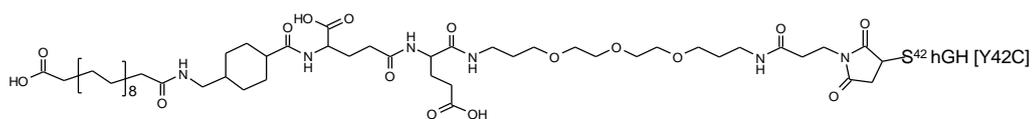
TOF-MS: Rt = 16,20 min, massa = 23339,7

## 45.5



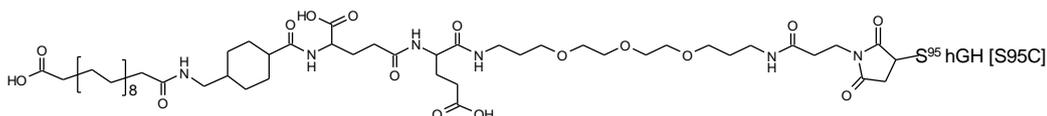
TOF-MS: Rt = 15,72 min, massa = 23316,35

## 45.6



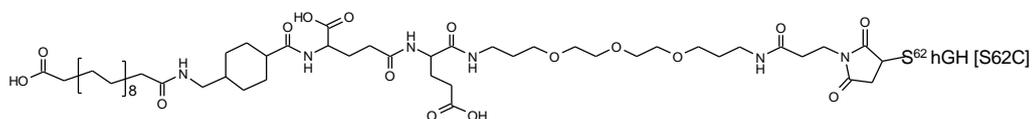
TOF-MS: Rt = 17,2 min, massa = 23365,9

45.7



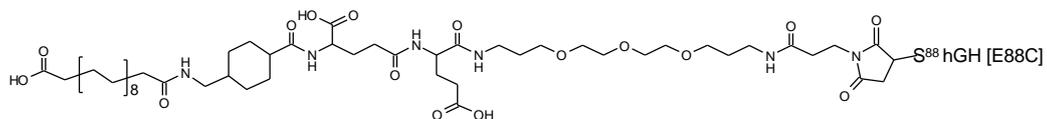
TOF-MS: Rt = 17,2 min, massa = 23366

45.8



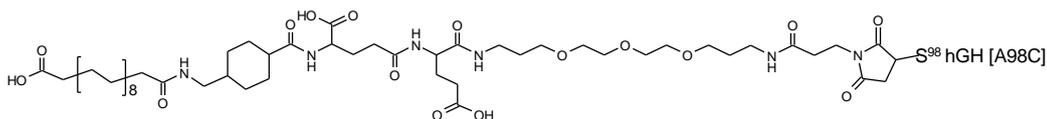
TOF-MS: Rt = 16,5 min, massa = 23366

45.9



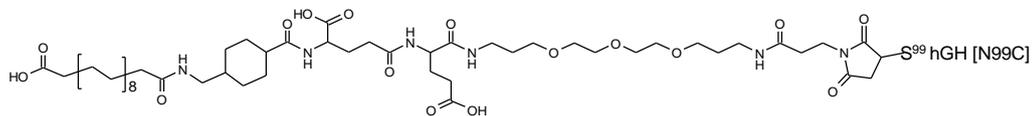
TOF-MS: Rt = 16,8 min, massa = 23323,8

45.10



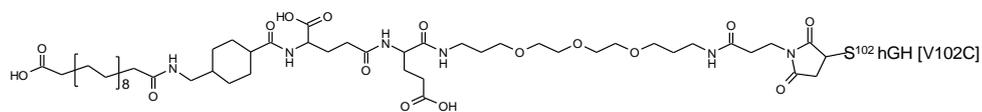
TOF-MS: Rt = 17,1 min, massa = 23382

45.11



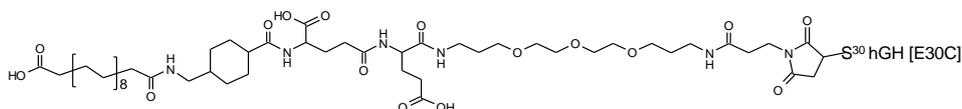
TOF-MS: Rt = 17,2 min, massa = 23338,8

45.12



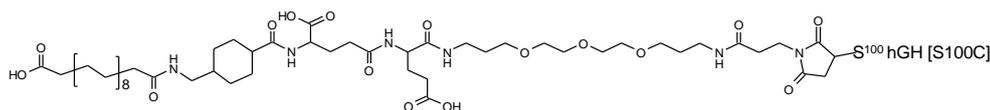
TOF-MS: Rt = 17 min, massa = 23353,9

## 45.13



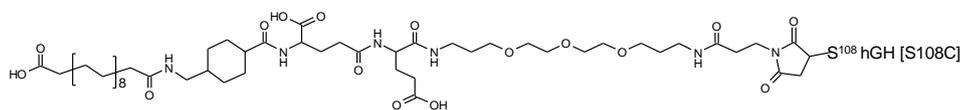
TOF-MS: Rt = 15,65 min, massa = 23323,7

## 45.14



TOF-MS: Rt = 16,5 min, massa = 23365,8

## 45.15



TOF-MS: Rt = 17,2 min, massa = 23365,9

Exemplo 46Ensaio (I) Ensaio de BAF-3GHR para determinar a atividade de hormônio do crescimento

[000589] As células BAF-3 (uma linhagem de célula linfóide pro-B de murino derivada da medula óssea) eram originalmente dependentes de IL-3 para crescimento e sobrevivência. IL-3 ativa JAK-2 e STAT que são os mesmos mediadores que GH está ativando quando da estimulação. Após transfecção do receptor de hormônio do crescimento humano a linhagem de célula foi transformada em uma linhagem de célula dependente de hormônio do crescimento. Este clone pode ser usado para avaliar o efeito de amostras de hormônio do crescimento diferentes sobre a sobrevivência de BAF-3GHR.

[000590] As células BAF-3GHR são cultivadas em meio de estarvação (meio de cultura sem hormônio do crescimento) por 24 horas a 37° C, CO<sub>2</sub> 5%.

[000591] As células são lavadas e ressuspensas em meio de estarvação e semeadas em placas. 10 µL de composto de hormônio

do crescimento ou hormônio do crescimento humano em concentrações diferentes ou controle são adicionados às células, e as placas são incubadas por 68 horas a 37° C, CO<sub>2</sub> 5%.

[000592] AlamarBlue® é adicionado a cada cavidade e as células são então incubadas por mais 4 horas. O AlamarBlue® é um indicador redox e é reduzido através de reações inatas a metabolismo celular e, então, provê uma medição indireta de número de célula viável.

[000593] Finalmente, a atividade metabólica das células é medida em uma leitora de placa fluorescente. A absorbância nas amostras é expressa em % de células não estimuladas com composto de hormônio do crescimento ou controle e a partir das curvas de concentração-resposta a atividade (quantidade de um composto que estimula as células com 50%) pode ser calculada.

[000594] Potência *in vitro* do composto 45.4 no ensaio de receptor de hGH BAF-3 é mostrada na Tabela 1 abaixo.

[000595] A estabilidade à protease do composto 45.5 foi determinada conforme descrito no método geral através da incubação do composto por 4 horas com quimiotripsina ou elastase. A porcentagem de composto de GH intacto foi medida e os resultados são incluídos na Tabela 1.

Tabela 1. Dados relacionados ao composto 45.4

Composto	EC50 (nM)	Razão (EC <sub>50</sub> cmp/EC <sub>50</sub> hGH)	n	Quimiotripsina (% de composto de GH intacto)	Elastase (% de composto de GH intacto)
hGH	0,026±0,012	1	6	40	25
45.4	0,09±0,043	3.5	6	75	65

#### Exemplo 47

#### Farmacocinética

[000596] A farmacocinética dos compostos dos exemplos é investigada em ratos Sprague Dawley após administrações de dose

única intravenosa (i.v.) e subcutânea (s.c.).

[000597] Os compostos de teste são diluídos para uma concentração final de 1 mg/mL em um tampão de diluição consistindo em: Glicina 20 mg/mL, manitol 2 mg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 2,5 mg/mL, pH ajustado para 8,2.

[000598] Os compostos de teste são estudados em ratos Sprague Dawley pesando 250 g. Os compostos de teste são administrados como uma injeção única ou i.v. na veia da cauda ou s.c. no pescoço com uma agulha de 25 G em uma dose de 60 nmol/kg de peso do corpo.

[000599] Para cada composto de teste amostragem de sangue é conduzida de acordo com o programa que segue apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Programa de amostragem de sangue para cada composto de teste

No. do animal	RoA	Momento da amostragem (h)													
		Pré-dose	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			

[000600] Em cada momento de amostragem 0,25 ml de sangue é retirado da veia da cauda usando uma agulha de 25 G. O sangue é amostrado em um tubo de teste revestido com EDTA e armazenado em gelo até centrifugação a 1200 x G por 10 minutos a 4<sup>o</sup> C. Plasma é transferido para um tubo Micronic e armazenado a -20<sup>o</sup> C até análise.

[000601] As concentrações do composto de teste são determinadas através de um ELISA sanduíche usando um anticorpo policlonal anti-hGH de porquinho-da-índia como uma armadilha, e proteína de ligação a hGH biotinilada (parte solúvel de receptor de GH humano) como detector. O limite de detecção do ensaio era 0,2 nM.

[000602] Uma análise farmacocinética não compartimental é realizada em perfis de concentração-tempo médios de cada composto de teste usando WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA). As estimativas de parâmetro farmacocinético de meia-vida terminal ( $t_{1/2}$ ) e tempo de residência médio (MRT) são calculadas.

Tabela 3. Meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e tempo de residência médio (MRT) de compostos de GH dos exemplos em ratos Sprague Dawley após administrações de dose única i.v. e s.c.

Composto (No. do Exemplo)	RoA	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)
43,0	i,v,	7,2	9,8
43,2	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
45,12	i,v,	5,8	6,8

[000603] A biodisponibilidade do exemplo 45.4 foi estimada para 48,3%. O tempo para concentração máxima no plasma ( $t_{max}$ ) após administração subcutânea foi 8,0 horas.  $C_{max}$  foi 1670 e 151 nM após

administrações i.v. e i.c., respectivamente. A concentração no plasma extrapolada no momento zero após concentração de administração i.v. foi 1710 nM.

#### Exemplo 48

[000604] A potência *in vitro* e as meias-vidas de uma série de compostos foram determinadas conforme descrito acima. Os conjugados dos compostos são idênticos, mas presos através de uma cisteína alternativa introduzida através de mutação conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Potência *in vitro* e meias-vidas (t<sub>1/2</sub>)

Composto	Potência <i>In vitro</i>	T <sub>½</sub> (Rato i.v.) (hora)	MRT (hora)	Sítio de ligação (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

#### Exemplo 49

Estudo de resposta de dose *in vivo* em ratos Sprague Dawley hipofisectomizados

[000605] A relação de dose-resposta *in vivo* é estudada em ratos Sprague Dawley machos hipofisectomizados. O rato hipofisectomizado é um modelo de animal bem conhecido e reconhecido de deficiência de hormônio do crescimento, em que nenhuma produção de hormônio do crescimento ocorre após a remoção cirúrgica da glândula pituitária. Isto também leva a níveis em circulação baixos de fator de crescimento-1 tipo insulina (IGF-1), outra característica clínica importante de deficiência de hormônio do crescimento em humanos.

[000606] A hipofisectomia é realizada em ratos machos de 4 semanas de vida pesando 90-100 g. Os animais entram no estudo 3-4 semanas após a cirurgia pesando 100-110 g. Os animais com um ganho de peso corporal de mais de 10% durante as 3-4 semanas após a cirurgia não são permitidos entrar no estudo.

[000607] Estudos de dose resposta são realizados usando cinco níveis de dose de composto 45.4 de 1-150 nmol/rato.

[000608] Os níveis de linha de base de IGF-1 no plasma em ratos Sprague Dawley hipofisectomizados foram aproximadamente 80-100 ng/mL em todos os grupos de dosagem. Após uma dose de IGF-1 única, os níveis aumentaram rapidamente para 800-1000 ng/mL no Dia 1 quase independentemente de dose. Os níveis de IGF-1 no plasma caíram novamente durante dos dias seguintes de uma maneira dependente da dose como declínio mais rápido visto com a dose mais baixa e o declínio mais lento com a dose mais alta. No dose mais alta o nível de IGF-1 no plasma foi mantido a 800-900 ng/mL por 3 dias antes de começar a cair mais rapidamente. Os níveis de concentração de IGF-1 no plasma eram elevados comparado com o grupo controle veículo para todos os grupos de dosagem até o Dia 3. Para dos grupos de dosagem de 10 nmoles, 50 nmoles e 150 nmoles ele era elevado durante todo o estudo (7 dias).

#### Exemplo 50

### Desaparecimento

[000609] É tomado como hipótese que a taxa de absorção está relacionada com a habilidade de uma molécula em passar as junções firmes dos capilares subcutâneos, uma propriedade relacionada com o tamanho molecular. Um PEG-hGH com um PEG de 40 kDa tem um peso molecular aparente (mw) de 150-250 kDa. Uma molécula de hGH com albumina ligada covalente tem mw = 87 kDa, enquanto uma molécula de hGH com uma albumina ligada não covalente será dissociada da parte albumina do tempo e então tem mw = 22 kDa. O tempo gasto no estado dissociado vai depender da afinidade da porção de ligação à albumina. Desta maneira a taxa de absorção de tais compostos deve ser mais rápida do que para PEG-hGH e a taxa deve aumentar com o uso de porções de ligação à albumina tendo afinidade menor para albumina.

[000610] As soluções de teste foram diluídas em tampão padrão consistindo em: Glicina 20 mg/mL, manitol 2 mg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mg/mL, pH ajustado para 8,2.

[000611] Iodinação com <sup>125</sup>I foi realizada pela Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S. A formulação radioativa final tinha uma atividade radioativa específica de 3 µCi/mL e foi fornecida em Penfills de 3 mL.

[000612] As soluções foram armazenadas a 2-8° C até serem usadas.

[000613] A taxa de desaparecimento para compostos selecionados foi medida em cinco porcos-fêmeas de cruzamento LYD. Os porcos são pesados, deixados em jejum e receberam um "revestimento de porco" especial a fim de carregar o contador e o transmissor gama e postos em cercados simples antes do início do estudo.

[000614] Todos os porcos são deixados em jejum por 18 horas antes do estudo.

[000615] Todos os animais foram dosados (60 nmoles) subcutaneamente nos lados esquerdo e direito do pescoço, respectivamente, com Novopen3® e NovoFine® 28G com rolha de agulha preta fixa. A profundidade da injeção era 5 mm.

[000616] O desaparecimento dos depósitos radioativos foi medido através de equipamento portátil por cerca de 24-48 horas.

[000617] Para cada animal individual, os resultados são apresentados como AUC (0-45 horas) conforme mostrado na Tabela 5.

[000618] A potência *in vitro*, meias-vidas e características adicionais de uma série de compostos foram determinadas conforme acima descrito e mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Características dos compostos

Composto	Potência <i>In vitro</i>	T <sub>½</sub> (Rato i.v.) (hora)	AUC de Desaparecimento (0-45 hora)	Duração de aumento de IGF-1 (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

Exemplo 51

Estudo *in vivo* em porcos

[000619] Para confirmar mais a funcionalidade de conjugados de hGH albumina de acordo com a invenção três compostos foram selecionados para estudos farmacocinéticos adicionais em porcos. Compostos iguais aos compostos 44.1, 44.4 e 44.5 foram preparados

conjugando o ligante de albumina à variante de hGH após remoção do tag de purificação de MAEA.

[000620] Os compostos de teste foram diluídos para a concentração final de 100 nmol/mL em tampão padrão (20 mg/mL de Glicina, 2 mg/mL de Manitol, 2,4 mg/mL de NaHCO<sub>3</sub>, pH ajustado para 8,2). Vinte e quatro miniporcões Göttingen machos de 5 meses de vida e pesando 9-12 kg foram usados no estudo. Cada composto de teste foi dosado para oito animais com quatro miniporcões recebendo administração de bolo intravenosa e quatro animais recebendo administração subcutânea. As injeções intravenosas foram dadas através de um Venflon de 24 G na orelha. A dose foi dada como um bolo de no máximo 5 segundos seguido por 2 mL de NaCl 0,9%. As injeções subcutâneas foram dadas no lado direito do pescoço, aproximadamente 5-7 cm a partir da orelha e 7-9 cm a partir do meio do pescoço. Cada animal recebeu uma dose única de composto de teste de 10 nmol/kg. Amostras de sangue foram coletadas de cada animal nos pontos de tempo que seguem: Pré-dose 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240 e 336 horas pós-injeção. Plasma foi isolado de cada amostra de sangue e armazenado a -20° C antes de ser analisado quanto ao composto de teste. Dados de concentração no plasma-tempo foram analisados através de um método farmacocinético não compartimental.

Tabela 6. Estimativas de parâmetro farmacocinético após administração subcutânea de dose única de 10 nmol/kg

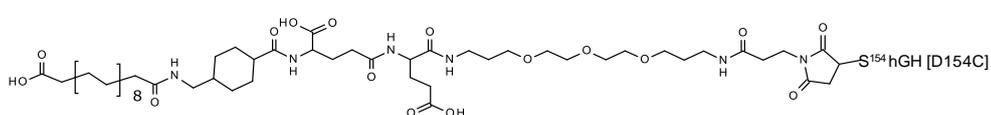
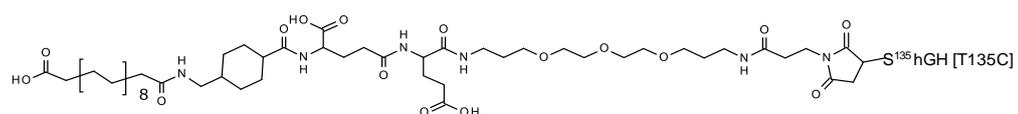
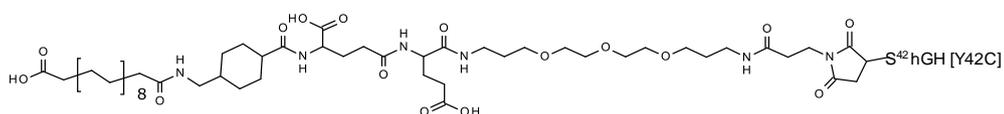
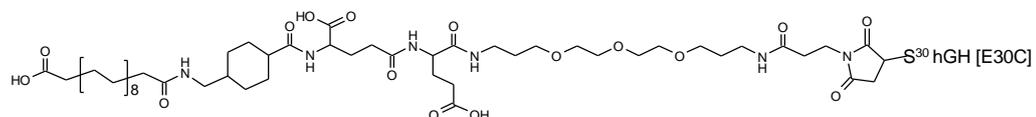
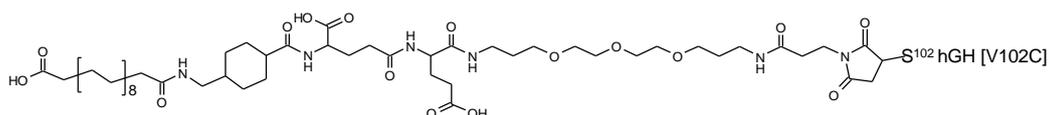
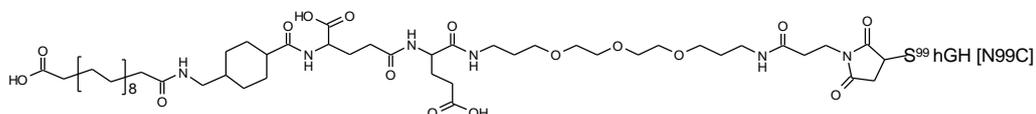
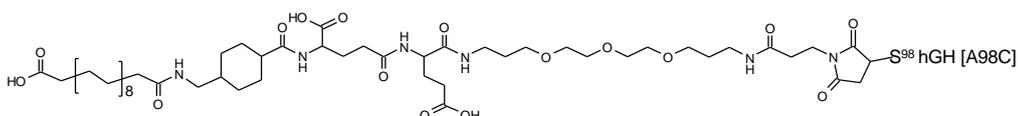
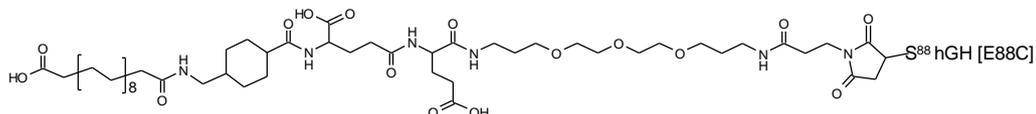
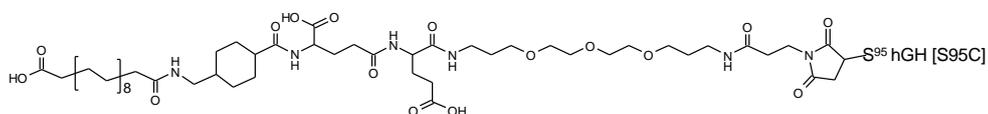
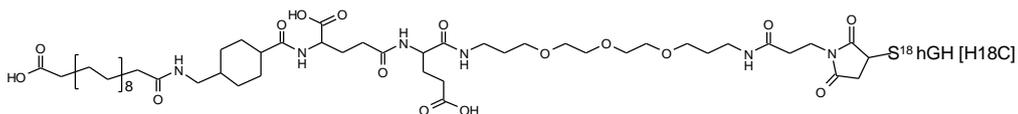
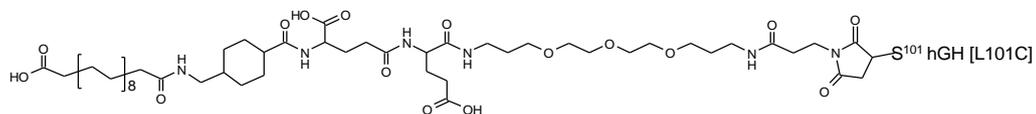
Com posto	ABW-Halo como em	AUC/dose (h*kg/l)	T <sub>½</sub> (h)	MRT (h)	MAT (h)	F (%)
51,1	44,1	139 (37,5)	11 (1,2)	30,6 (4,1)	10,0	38,6
51,2	44,5	101 (22,5)	12 (2,7)	25,2 (3,9)	11,6	60,8
51,3	44,4	144 (34,7)	12,6 (3,5)	33,1 (1,7)	12,1	35,6

Média ± SD em ( )

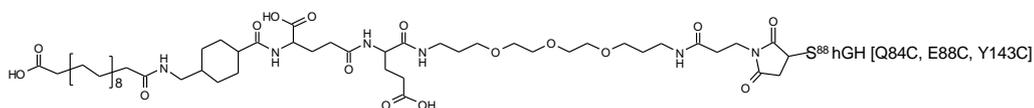
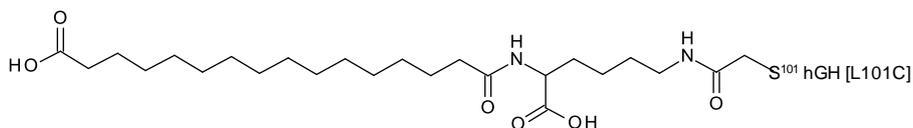
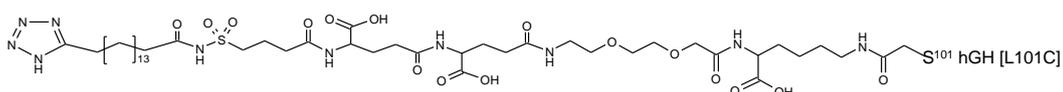
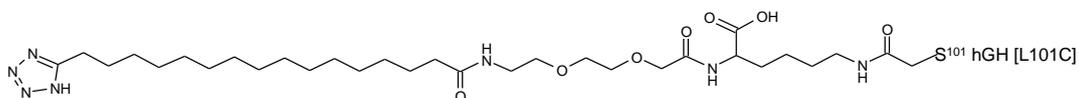
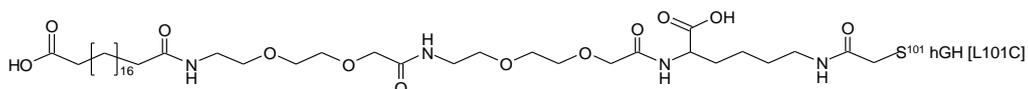
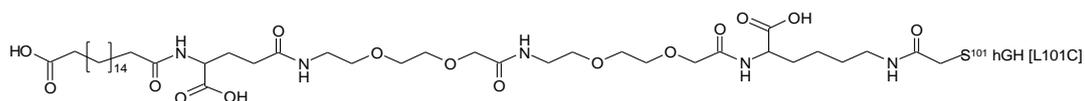
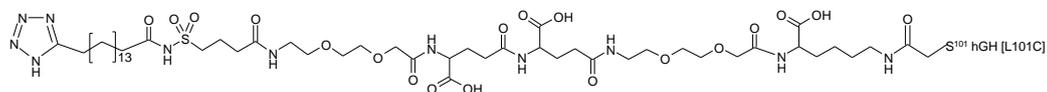
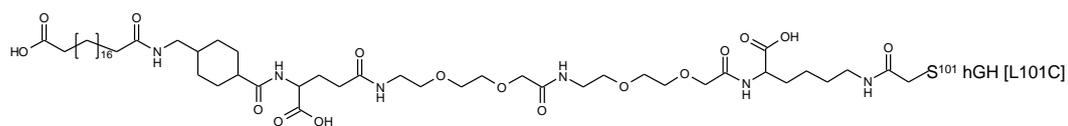
[000621] A Tabela 6 mostra parâmetros farmacocinéticos-chave para os três compostos de teste. A AUC/Dose é uma estimativa para a exposição corrigida de dose dos compostos de teste.  $T_{1/2}$  é a meia-vida terminal dos compostos de teste após a fase de absorção ter sido completada. MRT é o tempo de residência médio dos compostos de teste correspondendo ao tempo que a molécula de composto de teste média está no corpo. MAT é o tempo de absorção médio correspondente e é uma estimativa do tempo médio que a molécula está na fase de absorção. F é a biodisponibilidade absoluta dos compostos de teste com relação à administração intravenosa.

## REIVINDICAÇÕES

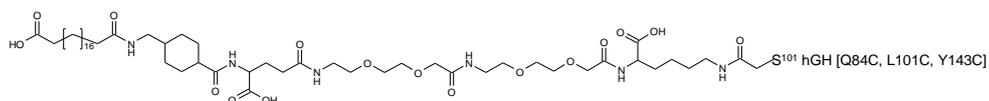
1. Conjugado de hormônio do crescimento, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:



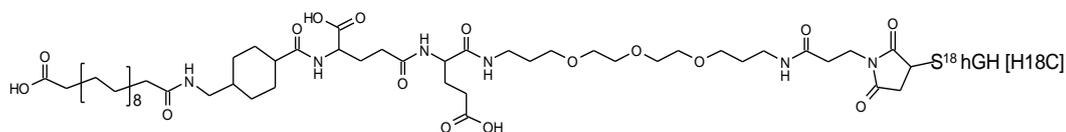
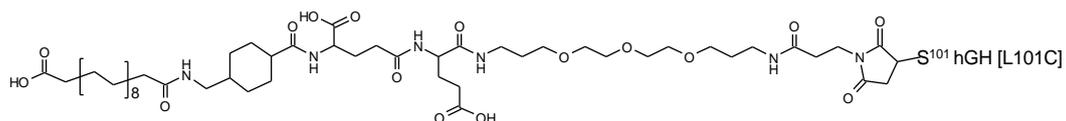


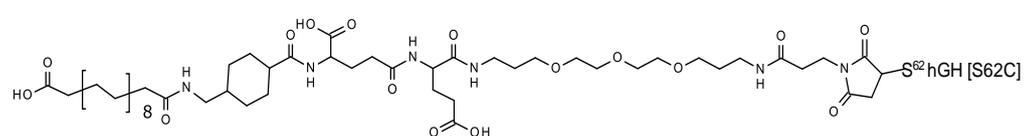
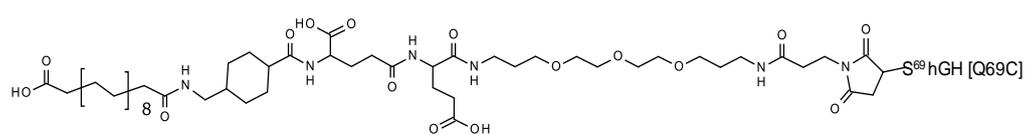
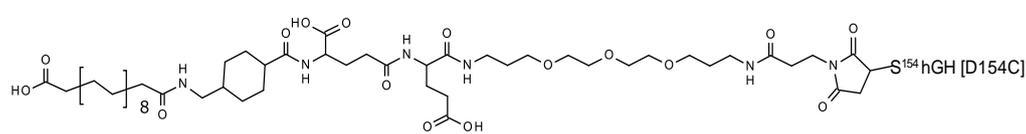
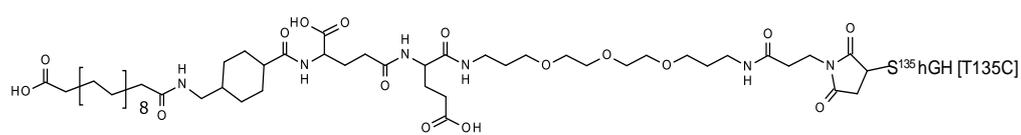
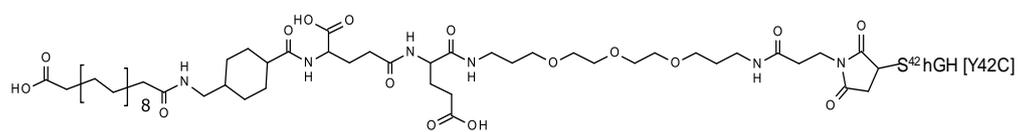
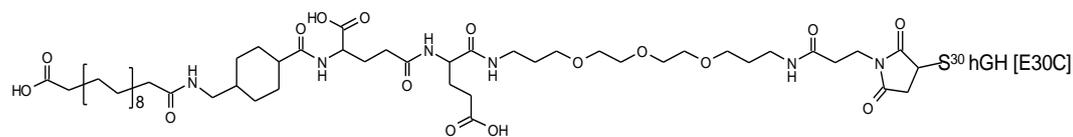
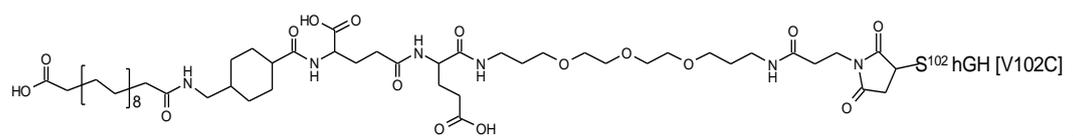
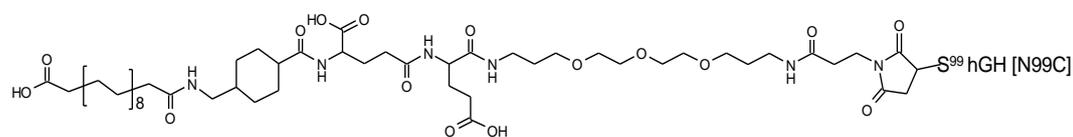
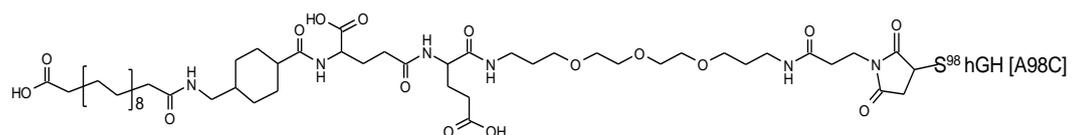
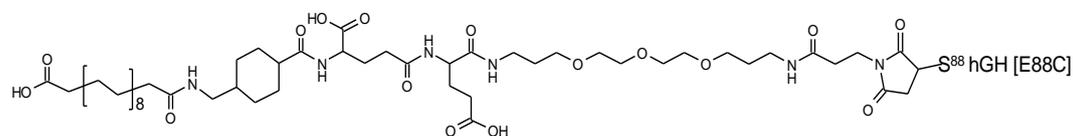
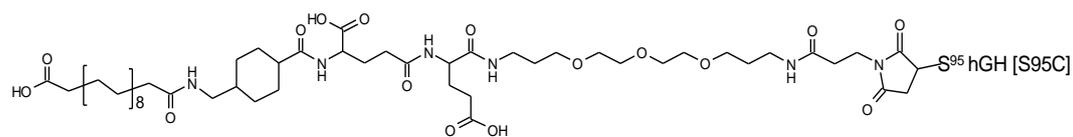


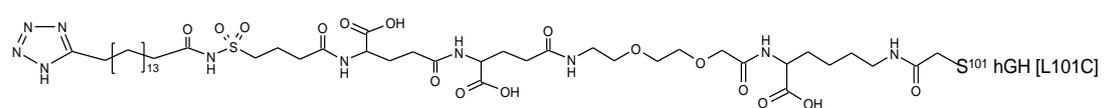
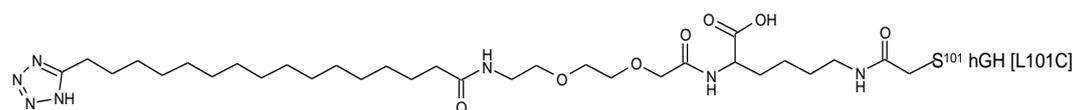
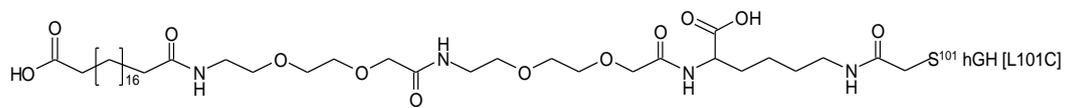
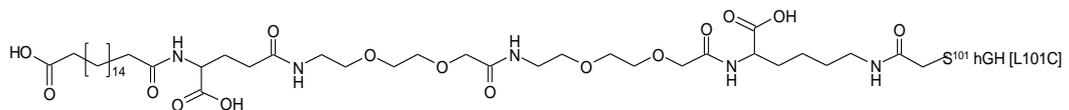
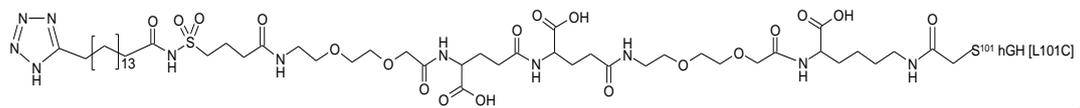
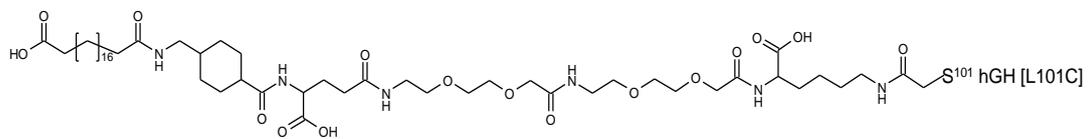
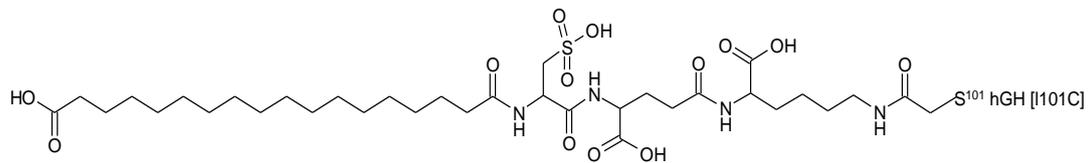
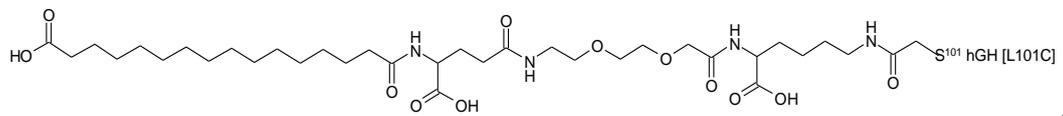
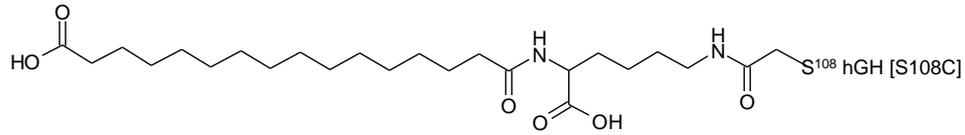
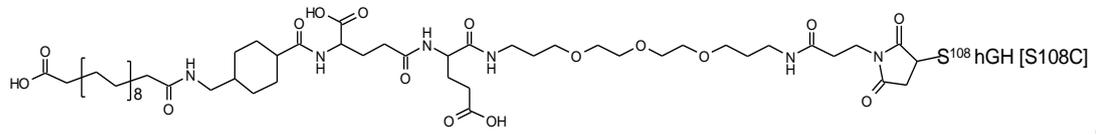
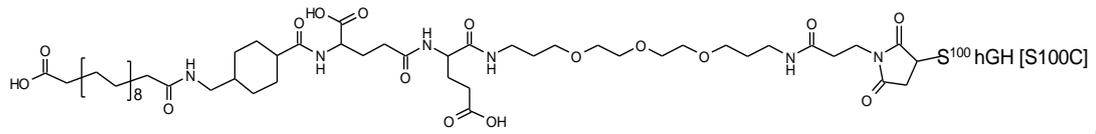
e



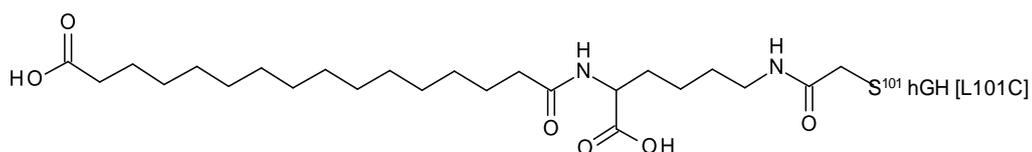
2. Conjugado de hormônio do crescimento, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:



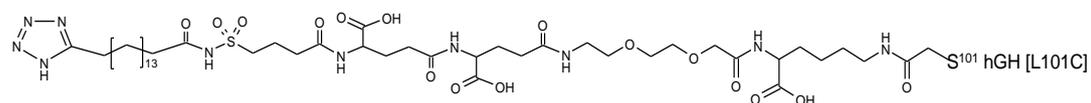
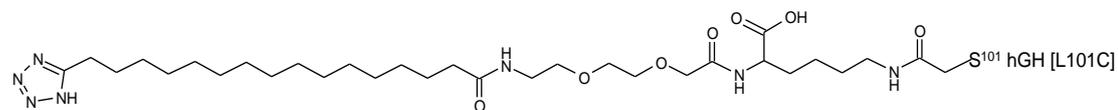
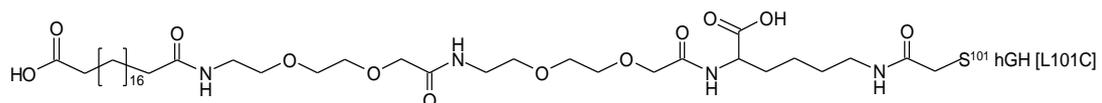
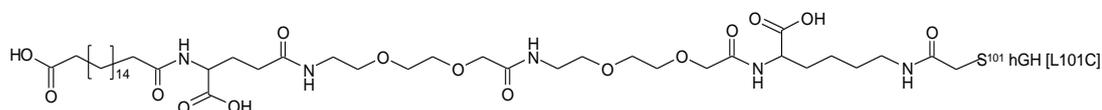
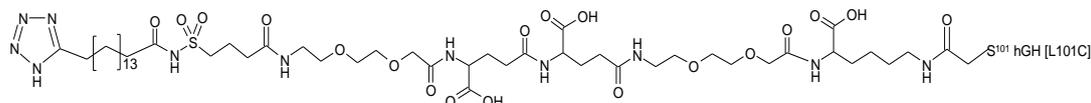
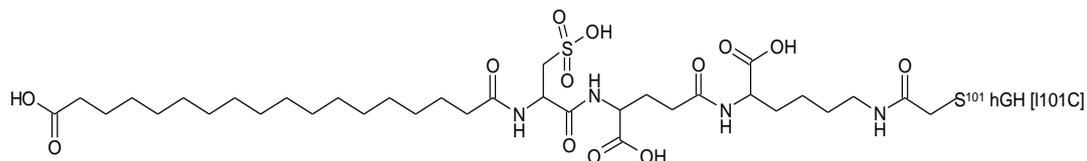
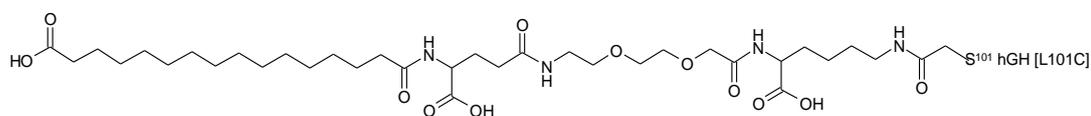
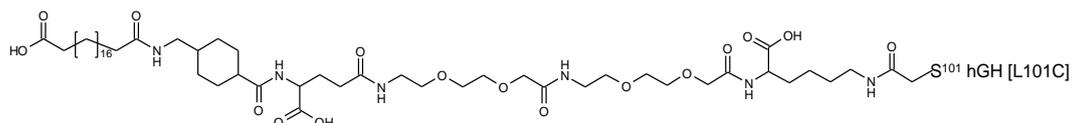




e



3. Conjugado de hormônio do crescimento, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:



4. Conjugado de hormônio do crescimento, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é:

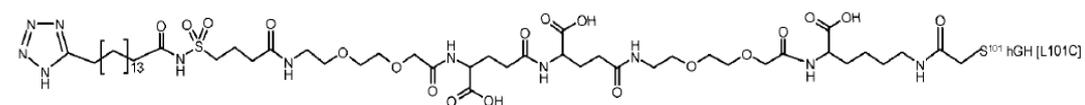


FIG. 1

