

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0611570-5 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2006
(43) Data da Publicação: 22/02/2011
(RPI 2094)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/48
C07K 14/61
A61K 38/00

(54) Título: **MÉTODOS PARA FIXAR COVALENTEMENTE PEG A UM POLIPEPTÍDEO E PARA MODIFICAR PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO, COMPOSTO E SAIS, PRÓ-DROGAS OU SOLVATOS FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS DO MESMO, HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE DOENÇA E, USO DE UM COMPOSTO**

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2005 EP 05105256.1,
18/10/2005 EP 05109667.5

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

(72) Inventor(es): Florencio Zaragoza Dörwald, Lars Fogh Iversen,
Niels Langeland Johansen

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006063246 de 15/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/134148 de 21/12/2006

(57) Resumo: MÉTODOS PARA FIXAR COVALENTEMENTE PEG A UM POLIPEPTÍDEO E PARA MODIFICAR PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO, COMPOSTO E SAIS, PRÓ-DROGAS OU SOLVATOS FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS DO MESMO, HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE DOENÇA, E, USO DE UM COMPOSTO. Método para PEGuilar hormônio de crescimento, referido método compreendendo reagir hormônio de crescimento com uma amina compreendendo nucleófilo que ainda compreende um primeiro grupo funcional na presença de TGase para formar um hormônio de crescimento transaminado, seguido por uma reação de referido hormônio de crescimento transaminado com um PEG que foi funcionalizado com um segundo grupo funcional, em que referido primeiro e segundo grupos funcionais são selecionados de modo que eles reagem para formar uma ligação covalente.

“MÉTODOS PARA FIXAR COVALENTEMENTE PEG A UM POLIPEPTÍDEO E PARA MODIFICAR PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO, COMPOSTO E SAIS, PRÓ-DROGAS OU SOLVATOS FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS DO MESMO, HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE DOENÇA, E, USO DE UM COMPOSTO”

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a um novo método para a conjugação pós-translacional de hormônio de crescimento em que a transglutaminase é usada para incorporar um ponto de fixação em posições específicas no peptídeo em que PEG pode ser seletivamente fixado. Os referidos hormônios de crescimento conjugados tem características alteradas e
15 podem ser assim usados em aplicações terapêuticas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Conhece-se bem modificar as propriedades e características de peptídeos por conjugação de grupos no peptídeo que devidamente muda as propriedades dos peptídeo. Esta conjugação geralmente requer algum grupo
20 funcional no peptídeo para reagir com outro grupo funcional em um grupo conjugante. Tipicamente, grupos amino, tal como o grupo amino N-terminal ou o grupo ϵ -amino em lisinas, tem sido usados em combinação com um reagente acilante apropriado. Com frequência é desejado ou mesmo requerido ser capaz de controlar a reação de conjugação, isto é controlar onde os
25 compostos conjugantes compostos fixados e controlar como muitos grupos conjugantes são fixados. Isto é com frequência referido como especificidade.

Conjugação de peptídeos em general tem sido conhecido por muito tempo, e US 4,179,337 descreve há mais de 20 anos atrás peptídeos, e em particular hormônio de crescimento conjugado em polietileno ou

polipropileno glicóis.

Diferentes tipos de químicas tem sido descritos, os quais são efetivos na formação de uma ligação entre o peptídeo e a porção a ser conjugada no peptídeo. EP 605 963 descreve um enxerto de polímeros aquosos que forma uma ligação oxima com um grupo aldeído em uma proteína. Nenhum dos aminoácidos naturais compreende um aldeído, assim um grupo hidroxila precisa ser oxidado em uma primeira etapa no processo de conjugação. WO 96/41813 descreve polímeros que são funcionalizados com um grupo formador de amino-óxi oxima, utilizável em reações de conjugação. WO 98/05363 descreve um composto compreendendo um peptídeo e um polímero solúvel em água, em que os dois são covalentemente ligados através de uma ligação oxima em um resíduo aminoácido N-terminal.

Além disso, o uso de enzimas para permitir uma conjugação mais específica de peptídeos é conhecido. EP 243 929 descreve o uso de enzimas proteolíticas, tal como carboxipeptidase para incorporar um composto com um grupo funcional no C-termino de um peptídeo, onde referido grupo funcional pode subsequente ser usado para fixar grupos citotóxicos, outros peptídeos ou grupos repórter usados para facilitar a análise dos peptídeos, tal como por exemplo grupos fluorescentes. Esta técnica, no entanto, limita o ponto de fixação do resíduo de aminoácido C-terminal, o que constitui uma severa limitação se o resíduo C-terminal for essencial para a atividade do peptídeo.

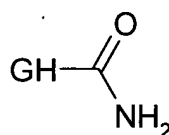
Transglutaminase tem sido usada anteriormente para alterar as propriedades de peptídeos. Na indústria alimentícia e particularmente na indústria de laticínios, muitas técnicas estão disponíveis para, por exemplo, reticular peptídeos usando transglutaminases. Outros documentos descrevem o uso de transglutaminase para alterar as propriedades de peptídeos fisiologicamente ativos. EP 950665, EP 785276 e Sato, Adv. Drug Delivery Rev. 54, 487-504 (2002) descreve a reação direta entre peptídeos

compreendendo pelo menos um Gln e PEG funcionalizado por amina ou ligandos similares na presença de transglutaminase, e Wada, Biotech. Lett. 23, 1367-1372 (2001) descreve a conjugação direta de β -lactoglobulina com ácidos graxos por meio de transglutaminase. O pedido de patente internacional publicado como WO2005/070468 descreve o uso de transglutaminase para incorporar um cabo à mesma onde os grupos conjugantes podem ser fixados.

É um objeto da presente invenção prover um método pelo qual hormônio de crescimento pode ser conjugado com PEG em posições específica com um alto grau de especificidade. Os conjugados obtidos por este método tem características melhoradas ou alternativas, por exemplo características farmacológicas, que os tornam apropriados, particularmente em terapia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em uma forma de realização, a invenção refere-se a um método de fixar covalentemente uma porção PEG a um hormônio de crescimento, o método compreende reagir, em uma ou mais etapas, um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representado por fórmula [Ia]



[Ia]

em que GH representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento, com um nucleófilo contendo nitrogênio de fórmula [II]



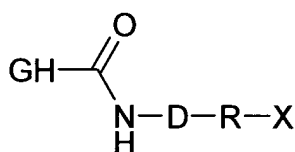
[II]

em que D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação única;

R representa C_{1-6} alquilenos, $-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-CH_2-$, $-(CH_2)_4-CH(NHCOCH_3)-CO-NH-CH_2-$, ou C_{5-15} heteroalquilenos;

X representa $-O-NH_2$, um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-O-NH_2$, um aldeído ou uma cetona;

na presença de transglutaminase para formar um hormônio de crescimento transaminado de fórmula [IIIa]



[IIIa]

opcionalmente, se X é um grupo latente, transformar referido grupo latente em $-O-NH_2$, um aldeído ou uma cetona,

referido hormônio de crescimento transaminado sendo ainda reagido com um segundo composto de fórmula [IV]

Y-Z

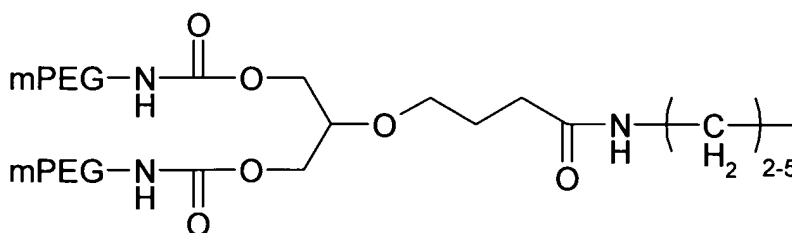
[IV]

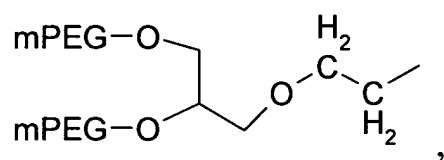
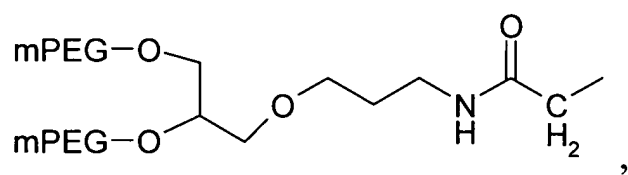
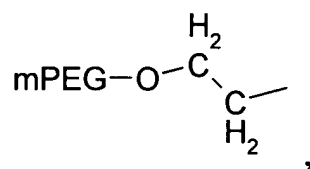
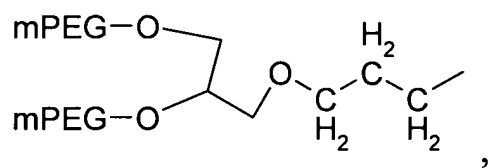
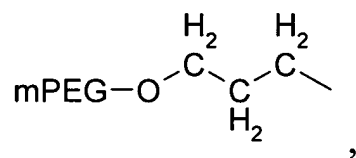
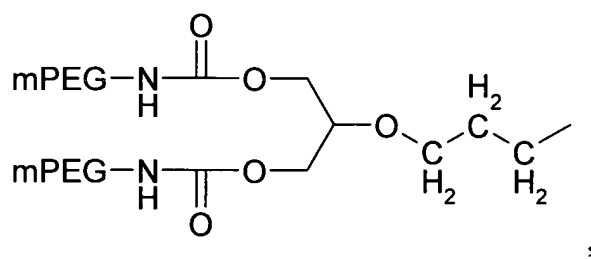
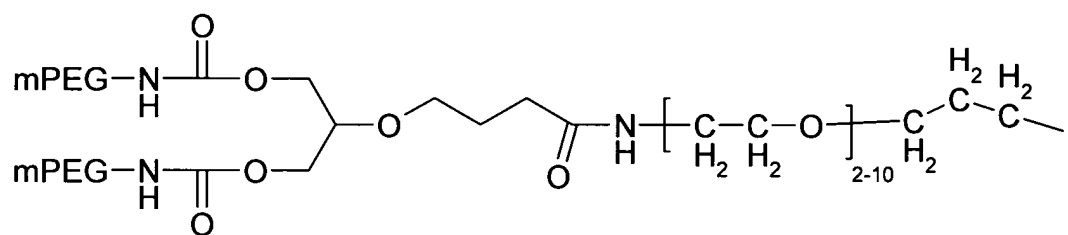
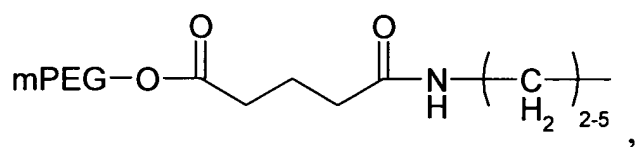
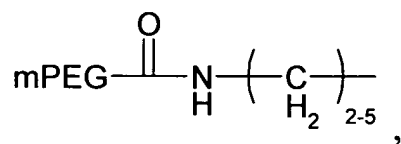
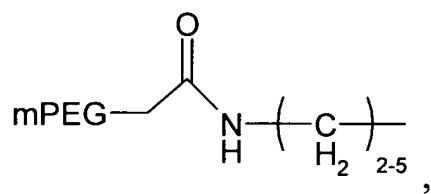
em que Y,

se X representa um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em um aldeído ou uma cetona, representa $-O-NH_2$; ou,

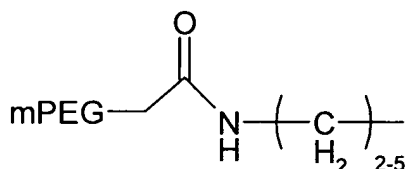
se X representa $-O-NH_2$, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-O-NH_2$, representa um aldeído ou uma cetona; e

Z representa uma porção selecionada dentre

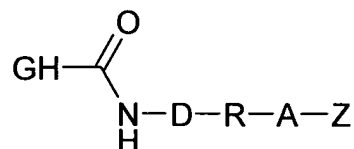




em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



desde que se Z é para formar um hormônio de crescimento PEGuilado de fórmula [Va]



[Va]

em que A representa uma ligação oxima.

5 Em uma forma de realização, a invenção provê compostos de fórmula [V] ou [Va] e qualquer sal, pró-droga ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo.

Em uma forma de realização, a invenção provê hGH, que foi PEGuilado na posição correspondendo à posição 40 e/ou 141 em SEQ ID No.

10 1.

Em uma outra forma de realização, a invenção provê composições compreendendo compostos de fórmula [V] ou [Va], e em particular composições farmacêuticas compreendendo compostos de fórmula [Va].

15 Em uma forma de realização, a invenção provê o uso de compostos de fórmula [Va] em terapia.

Em uma forma de realização, a invenção provê um método de tratamento de doenças que se beneficiam de um aumento no nível do nível de hormônio de crescimento no plasma, o método compreendendo a
20 administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de fórmula [Va].

Em uma forma de realização, a invenção provê o uso de um composto de fórmula [Va] na fabricação de um medicamento para o tratamento de doenças se beneficiando de um aumento no nível no plasma de

hormônio de crescimento.

Em uma forma de realização, a invenção provê um método para melhorar ou modificar as propriedades farmacológicas de hormônio de crescimento, o método compreendendo PEGuilar referido hormônio de crescimento de acordo com os métodos da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

SEQ ID No. 1 é a seqüência de aminoácidos de hormônio de crescimento humano, também conhecido como 22K-hGH.h

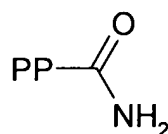
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na observação de que a PEGuilação no N-término e em particular no C-término de hGH dá lugar a uma diminuição bem maior na atividade do que a PEGuilação em alguns aminoácidos entre os dois terminos, isto é PEGuilação em cadeia. Em particular, a PEGuilação nas posições correspondendo às posições 40 e/ou 141 em um hGH tendo uma seqüência de SEQ ID No.1 dá lugar a hGH PEGuilado em que uma grande proporção de uma atividade foi retida. Posições 40 e 141 são ambas glutamina, e, de fato, um hGH tendo uma seqüência de SEQ ID No. 1 compreende ainda 11 resíduos de glutaminase, ou seja em posições 22, 29, 46, 49, 68, 69, 84, 91, 122, 137, e 181.No entanto, verificou-se surpreendentemente que o uso de transglutaminase (TGase), e em particular TGase de *Streptoverticillium mobaraenae* ou *Streptomyces lydicus* permite uma PEGuilação seletiva em posições 40 e/ou 141, e que os restantes 11 resíduos de glutaminase são deixados inalterados apesar do fato de que a glutamina ser um substrato para transglutaminase.

O método da presente invenção também pode ser utilizável para a PEGuilação em cadeia de qualquer polipeptídeo compreendendo um ou mais resíduos de glutaminas, por exemplo os polipeptídeos terapeuticamente interessantes. Isto é particularmente utilizável para a peguilação de polipeptídeos, que compreende mais de um resíduo de glutamina, e em que

uma PEGuilação específica para sítio é desejada, mas o método pode ser usado para transglutaminar qualquer resíduo de glutamina compreendendo polipeptídeo.

A presente invenção assim provê um método para fixar covalentemente PEG a um polipeptídeo compreendendo pelo menos um resíduo de glutamina, referido método compreende reagir, em uma ou mais etapas, este resíduo de glutamina compreendendo polipeptídeo representado por fórmula [I]



[I]

em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no polipeptídeo, com um nucleófilo contendo nitrogênio de fórmula [II]



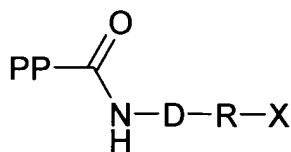
[II]

em que D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação única;

R representa C_{1-6} alquileno, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, ou C_{5-15} heteroalquileno;

X representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona;

na presença de transglutaminase para formar um polipeptídeo transaminado de fórmula [III]



[III]

opcionalmente, se X é um grupo latente, transformar referido grupo latente em $-O-NH_2$, um aldeído ou uma cetona,

referido polipeptídeo transaminado sendo ainda reagido com um segundo composto de fórmula [IV]

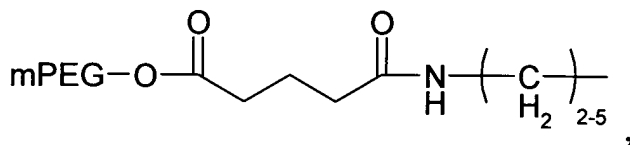
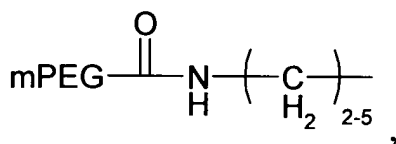
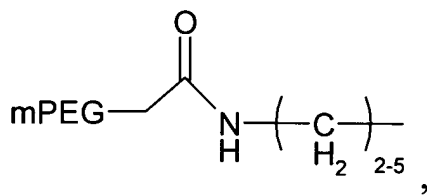
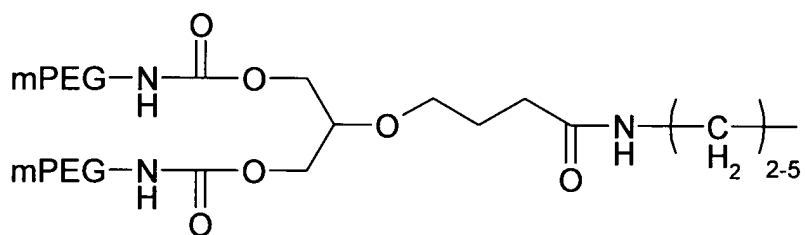


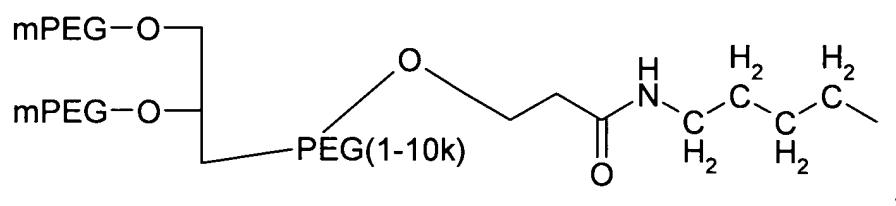
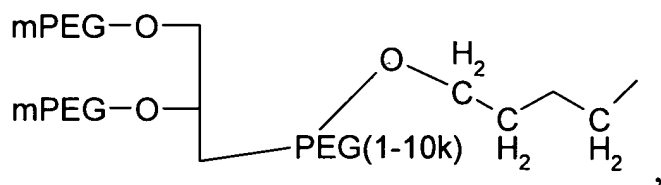
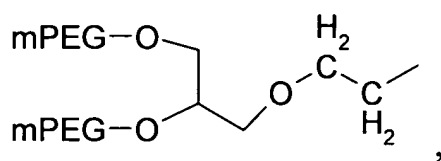
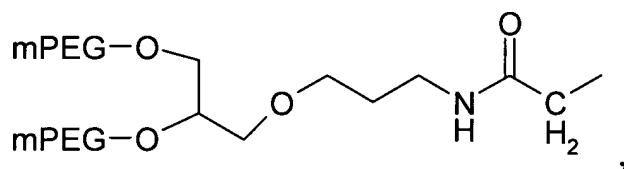
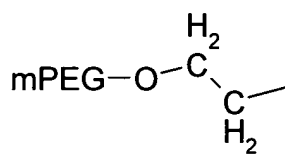
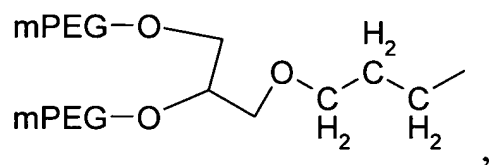
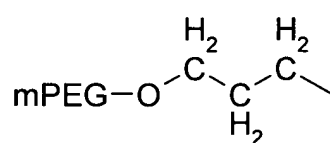
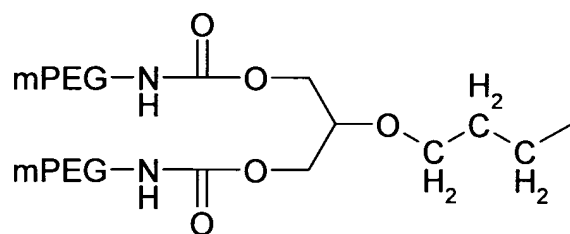
5 em que Y,

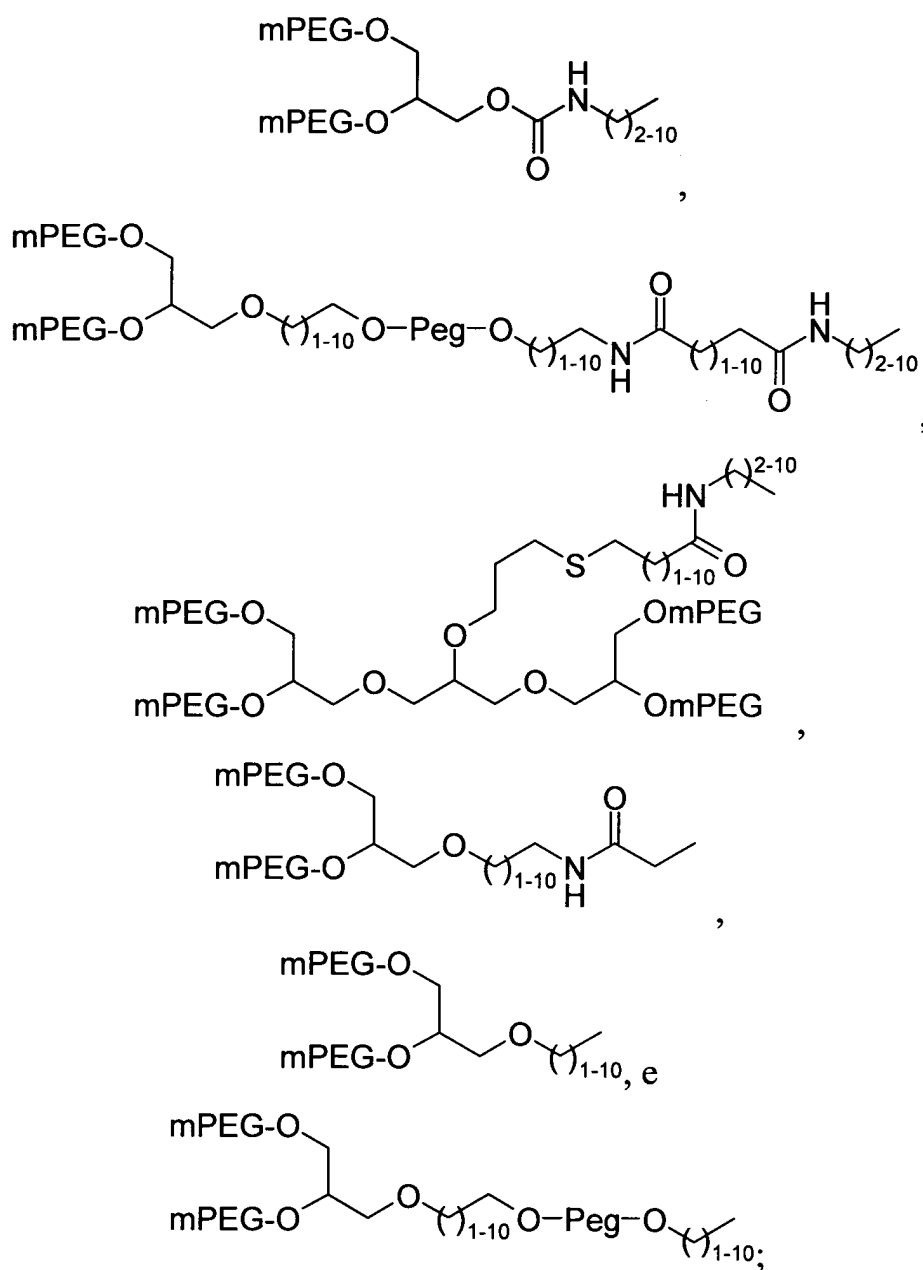
se X representa um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em um aldeído ou uma cetona, representa $-O-NH_2$; ou,

10 se X representa $-O-NH_2$, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-O-NH_2$, representa um aldeído ou uma cetona; e

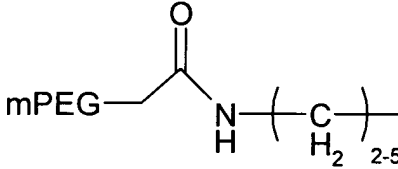
Z representa uma porção selecionada dentre

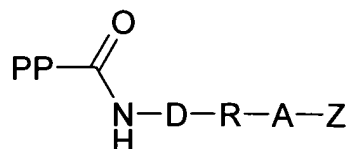






em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

desde que se Z é , então PEG é 10 kDa PEG para formar um PEGuilado polipeptídeo de fórmula [V]



em que A representa uma ligação oxima;

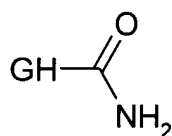
ou qualquer sal, pró-droga ou solvato farmacêuticamente aceitável do mesmo.

O termo polipeptídeo como usado aqui inclui qualquer
5 apropriado polipeptídeo e pode ser usado como sinônimo com os termos
peptídeo e proteína, salvo indicado em contrário ou contradito por contexto. O
termo polipeptídeo aqui deve ser geralmente entendido como se referindo a
qualquer apropriado polipeptídeo de qualquer apropriado tamanho e
composição (com relação ao número de aminoácidos e número de cadeias
10 associadas na molécula da proteína). Além disso, polipeptídeos no contexto
dos métodos inventivos e composições descritos aqui podem compreender
resíduos de ocorrência natural ou não L- aminoácido L, salvo indicado em
contrário ou contradito por contexto. Os polipeptídeos também podem ser
derivatizados. Um polipeptídeo derivatizado deve geralmente ser entendido
15 como se referindo a um polipeptídeo em que um ou mais dos resíduos de
aminoácidos dos polipeptídeo foram quimicamente modificados (por exemplo
por alquilação, acilação, formação de éster, ou formação amida) ou associado
com um ou mais substituintes moleculares não aminoácidos atômicos,
orgânicos e/ou inorgânicos e também podem ou alternativamente
20 compreender resíduos não essenciais, não de ocorrência natural, e/ou não L
aminoácidos, salvo indicado em contrário ou contradito por contexto.
Exemplos não limitativos destes resíduos de aminoácido incluem por exemplo
ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, β -alanina, ácido β -
aminopropiônico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-
25 aminocaproico, ácido 2-aminoheptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-
aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico,
desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, N-
etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxiprolina,
4-hidroxiprolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilglicina, N-

metilisoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, e aminoácidos estatina halogenados. Polipeptídeos, que são terapeuticamente utilizáveis e onde a terapia usando os polipeptídeos deve se beneficiar de, por exemplo, um tempo de retenção aumentado, são particularmente apropriados para uso em um método da presente invenção.

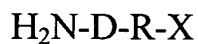
Em uma forma de realização, o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento.

A presente invenção assim provê um método para fixar covalentemente PEG a um hormônio de crescimento, o método compreende reagir, em uma ou mais etapas, um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representado por fórmula [Ia]



[Ia]

em que GH representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento, com um nucleófilo contendo nitrogênio de fórmula [II]



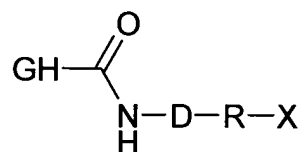
[II]

em que D representa -O- ou uma ligação única;

R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, ou C_{5-15} heteroalquilenos;

X representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona;

na presença de transglutaminase para formar um hormônio de crescimento transaminado de fórmula [IIIa]



[IIIa]

opcionalmente, se X é um grupo latente, transformar referido grupo latente em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona,

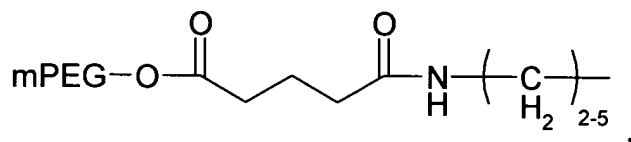
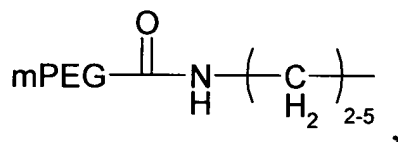
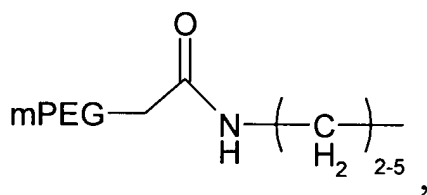
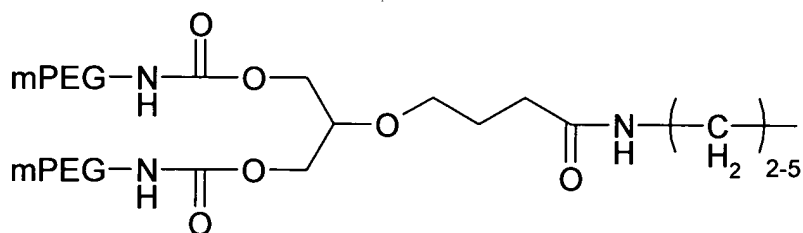
5 referido hormônio de crescimento transaminado sendo ainda reagido com um segundo composto de fórmula [IV]

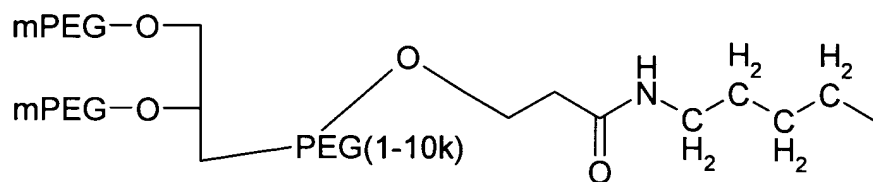
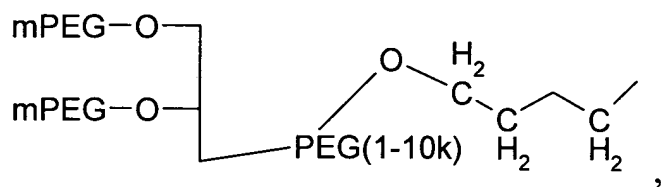
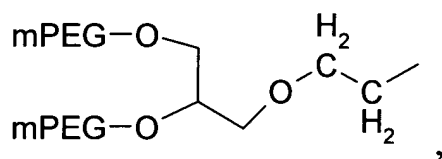
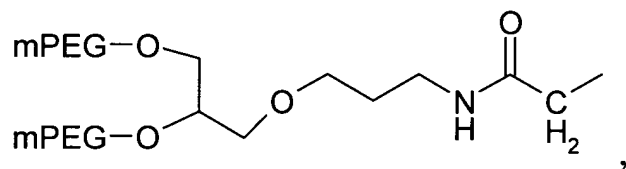
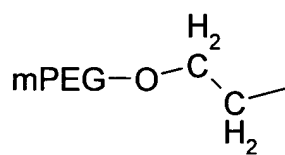
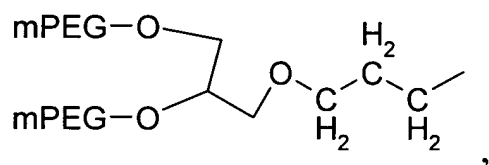
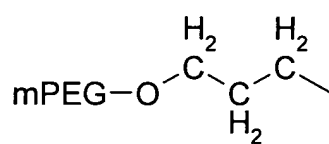
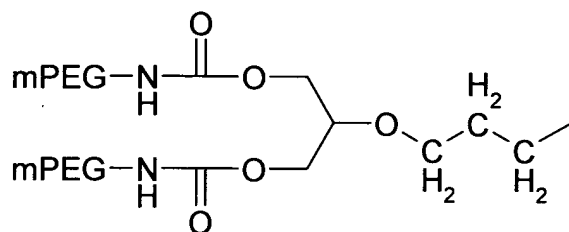
Y-Z

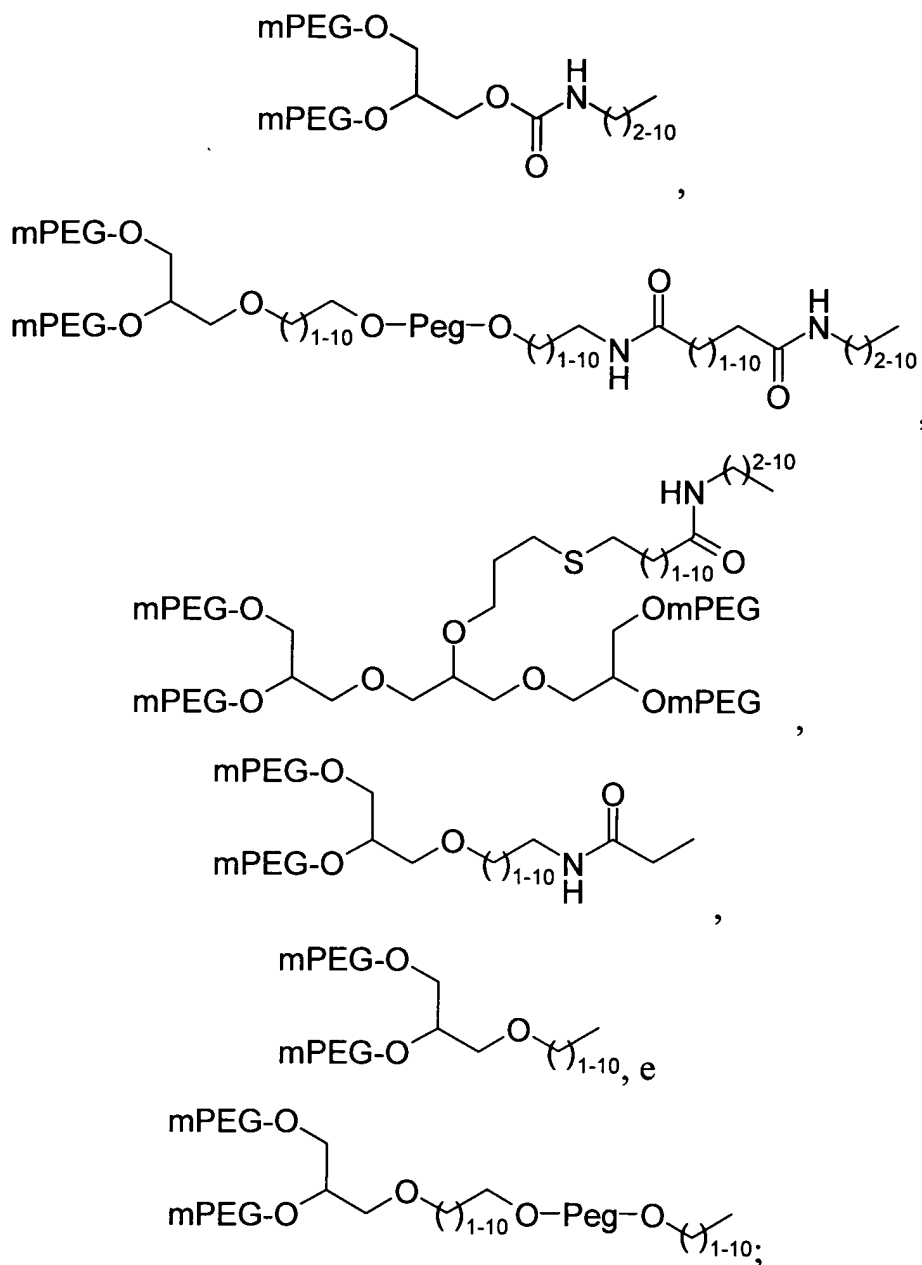
[IV]

em que Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, aldeído, cetona; e

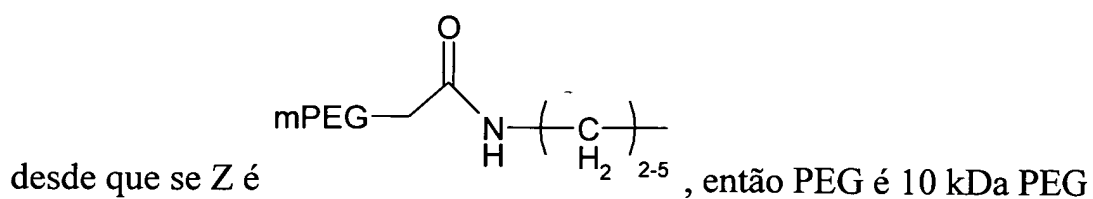
Z representa uma porção selecionada dentre





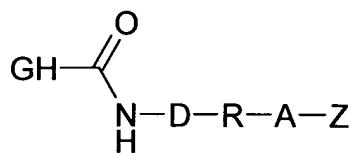


em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



desde que se Z é

para formar um hormônio de crescimento PEGuilado de



[Va]

em que A representa uma ligação oxima;

ou qualquer sal, pró-droga ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

No presente contexto, “hormônio de crescimento” (GH) destina-se a indicar uma proteína que demonstra atividade de hormônio de crescimento como determinado em teste I aqui. A proteína que demonstra uma atividade acima de 20%, tal como acima de 40%, tal como acima de 60%, tal como acima de 80% deste hGH no referido teste é definido como um hormônio de crescimento.

No presente contexto, o termo “transaminação” e termos relacionados destinam-se a indicar a reação onde nitrogênio na cadeia lateral de glutamina é trocado com nitrogênio de outro composto, em particular nitrogênio de outro nitrogênio contendo nucleófilo.

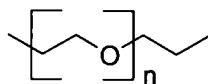
O termo “radical” ou “biradical” destina-se a indicar um fragmento molecular com um ou dois elétrons sem par, respectivamente. Este fragmento pode ser formalmente gerado por remoção de um (por exemplo, a hidrogênio) ou dois átomos ou grupos de átomos (por exemplo, um grupo hidroxila) por clivagem de ligação homolítica, isto é uma clivagem de ligação, em que cada dos dois fragmentos resultantes contém um dos dois elétrons que formaram a ligação original. Como usado aqui, “hGH(141)” significa um radical formado por remoção formal dos grupos CONH₂- de glutamina(141) em hGH, “hGH(40)” significa um radical formado por remoção formal dos grupos CONH₂- de glutamina(40) em hGH, e “hGH(40,141)” significa um radical formado por remoção formal dos grupos CONH₂- de glutamina(40) e glutamina(141) em hGH. hGH(40/141) significa um radical formado por remoção formal dos grupos CONH₂- de

glutamina(40) e/ou glutamina(141) em hGH, englobando misturas de dois ou mais de hGH(40), hGH(141), e (hGH(40,141).

O termo “alquilenos” destina-se a indicar um bi-radical de um hidrocarboneto saturado, linear, ramificado e/ou cíclico. Salvo especificado com outro número de átomos de carbono, o termo destina-se a indicar hidrocarbonetos com de 2 a 6 (ambos incluídos) átomos de carbono, tal como 2 a 5 (ambos incluídos), tal como de 2 a 4 (ambos incluídos), por exemplo de 2 a 3 (ambos incluídos). Particulares exemplos incluem etileno, propileno, butileno, pentileno e hexileno.

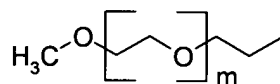
O termo heteroalquilenos destina-se a indicar um alquilenos como indicado acima de em que um ou mais grupos metileno foram substituídos com –O–. Particulares exemplos incluem diradicais de polietileno glicol.

O termo “PEG” ou "Peg" significa um diradical polidisperso ou monodisperso da estrutura



em que n é um inteiro maior do que 1, e seu peso molecular está entre aproximadamente 100 e aproximadamente 1,000,000 Da.

O termo “mPEG” ou "mPeg" significa um radical polidisperso ou monodisperso da estrutura



em que m é um inteiro maior do que 1. Assim, um mPEG em que m é 90 tem um peso molecular de 3991 Da, isto é aproximadamente 4kDa. Do mesmo modo, um mPEG com um peso molecular médio de 20 kDa tem um m médio de 454. Devido ao processo para produzir mPEG estas moléculas com frequência tem uma distribuição de pesos moleculares. Esta distribuição é descrita pelo índice de polidispersidade.

O termo “índice de polidispersidade” como usado aqui

significa a relação entre peso molecular médio ponderal e o peso molecular médio numérico, como conhecido na técnica de química de polímeros (ver por exemplo “Polymer Síntese and Characterization”, J.A. Nairn, University de Utah, 2003). O índice de polidispersidade é um número que é maior do que
5 ou igual a um, e pode ser estimado a partir dos dados de cromatografia de permeação de gel. Quando o índice de polidispersidade é 1, o produto é monodisperso e é assim feito de compostos com um peso molecular único. Quando o índice de polidispersidade é maior do que 1, ele é uma medida da polidispersidade deste polímero, isto é como é ampla a distribuição de
10 polímeros com diferentes pesos moleculares.

O uso de, por exemplo, "mPEG20000" ou “mPEG(20k)” em fórmulas, nomes compostos ou em estruturas moleculares indica um resíduo mPEG em que mPEG é polidisperso e tem um peso molecular de aproximadamente 20 kDa.

15 O índice de polidispersidade tipicamente aumenta com o peso molecular do PEG ou mPEG. Quando referência é feita a 20 kDa PEG e em particular 20 kDa mPEG, destina-se a indicar um composto (ou de fato a mistura de compostos) com um índice de polidispersidade abaixo de 1,06, tal como abaixo de 1,05, tal como abaixo de 1,04, tal como abaixo de 1,03, tal
20 como entre 1,02 e 1,03. Quando referência é feita a 30 kDa PEG e em particular 30 kDa mPEG, destina-se a indicar um composto (ou de fato a mistura de compostos) com um índice de polidispersidade abaixo de 1,06, tal como abaixo de 1,05, tal como abaixo de 1,04, tal como abaixo de 1,03, tal como entre 1,02 e 1,03. Quando referência é feita a 40 kDa PEG e em
25 particular 40 kDa mPEG, destina-se a indicar um composto (ou de fato a mistura de compostos) com um índice de polidispersidade abaixo de 1,06, tal como abaixo de 1,05, tal como abaixo de 1,04, tal como abaixo de 1,03, tal como entre 1,02 e 1,03.

O termo “GH PEGuilado” ou ” hGH PEGuilado” destina-se a

indicar GH ou hGH que foi covalentemente fixado a PEG, isto é, ele indica um conjugado compreendendo GH ou hGH e PEG, em que referido GH ou hGH e referido PEG são covalentemente ligados um no outro. A referida fixação pode ser via um ligador.

5 O termo "conjugado" como um nome, destina-se a indicar um peptídeo modificado, isto é um peptídeo com uma porção ligada ao mesmo para modificar as propriedades de referido peptídeo. Como um verbo, o termo destina-se a indicar o processo de ligação de uma porção a um peptídeo para modificar as propriedades de referido peptídeo.

10 O termo "ligação oxima" destina-se a indicar uma subestrutura química da estrutura $-O-N=$. Na fórmula estrutural, como usado aqui, a ligação de oxima representada por A na fórmula pode ser posicionada em qualquer direção, isto é ou $-O-N=$ ou $=N-O-$. Em uma forma de realização, a direção da ligação oxima na fórmula estrutural dada é $-O-N=$. Em outra forma
15 de realização, a direção da ligação oxima na fórmula estrutural dada é $=N-O-$.

No presente contexto, o termo "sal farmacologicamente aceitável" destina-se a indicar sais que não são prejudiciais para o paciente. Estes sais incluem sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis, sais de metal farmacologicamente aceitáveis, sais de amônio e amônio alquilado.

20 Os sais de adição de ácido incluem sais de ácidos inorgânicos assim como ácidos orgânicos. Representativos exemplos de ácidos inorgânicos apropriados incluem ácidos clorídrico, bromídrico, iodídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico e outros. Exemplos representativos de ácidos orgânicos apropriados incluem ácidos fórmico, acético, tricloroacetico, trifluoroacetico,
25 propiônico, benzóico, cinâmico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malônico, mandélico, oxálico, picrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanossulfônico, etanossulfônico, tartárico, ascórbico, pamóico, bismetileno salicílico, etanodissulfônico, glucônico, citracônico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzóico, glutâmico,

benzenossulfônico, p-toluenossulfônico e outros. Outros exemplos de sais inorgânicos ou orgânicos de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais farmaceuticamente aceitáveis listados em J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2, que é incorporado aqui por referência. Exemplos de sais de metal
5 incluem sais de lítio, sódio, potássio, magnésio e outros. Exemplos de sais de amônio e amônio alquilado incluem sais amônio, metilamônio, dimetilamônio, trimetilamônio, etilamônio, hidroxietilamônio, dietilamônio, butilamônio, tetrametilamônio e outros.

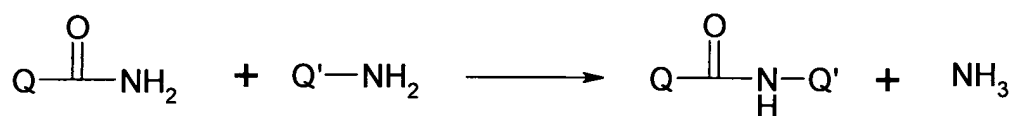
O termo “pró-droga” como usado aqui destina-se a indicar um
10 composto que não tem ou não tem necessariamente uma atividade terapêutica mas que, quando da administração, é transformado em um composto terapeuticamente ativo por uma reação ocorrendo no corpo. Tipicamente, estas reações são hidrólise, por exemplo por esterases ou oxidações. Exemplos de pró-drogas incluem amidas bio-hidrolisáveis e ésteres bio-
15 hidrolisáveis e também engloba a) compostos em que a funcionalidade bio-hidrolisável no pró-droga é englobada 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 as substâncias de fármaco de acordo com a presente invenção. Exemplos destes grupos
20 funcionais incluem 1,4-dihidropiridina, N-alkilcarbonil-1,4-dihidropiridina, 1,4-ciclohexadieno, terc-butila, e outros.

Como usado aqui, o termo “amida bio-hidrolisável” é uma amida de uma substância de fármaco (no caso, um composto de acordo com a presente invenção) que ou a) não interfere com a atividade biológica da
25 substância parental mas confere sobre esta substância propriedades vantajosas em vivo, tal como duração de ação, início de ação, e outros, ou b) é biologicamente inativo mas é prontamente convertido em vivo pelo indivíduo em um princípio biologicamente ativo. A vantagem é que, por exemplo, uma solubilidade aumentada em que a amida bio-hidrolisável é oralmente

absorvida do intestino e é transformada em um composto de acordo com a presente invenção em plasma. Muitos exemplos destes são conhecidos na técnica e incluem, por título de exemplo, amidas de alquila inferior, α -aminoácido amidas, alcoxiacila amidas, e alquilaminoalquilcarbonila amidas.

5 Como usado aqui, o termo “éster bio-hidrolisável” é um éster de uma substância de fármaco (no caso, um composto de acordo com a invenção) que ou a) não interfere com a atividade biológica da substância parental mas confere nesta substância propriedades vantajosas *em vivo* tal como duração de ação, início de ação, e outros, ou b) é biologicamente inativo
 10 mas é prontamente convertido *em vivo* pelo indivíduo em um princípio biologicamente ativo. A vantagem é, por exemplo solubilidade aumentada ou que o éster bio-hidrolisável é oralmente absorvido do intestino e é transformado em um composto de acordo com a presente invenção em plasma. Muitos exemplos destes são conhecidos na técnica e incluem por
 15 meio de exemplo ésteres de C₁-C₄alquila, ésteres de C₁-C₄aciloxialquila, ésteres de C₁-C₄alcoxiaciloxialquila, ésteres de alcoxiacilóxi, ésteres alquil acilamino alquila, e ésteres de colina.

Transglutaminase (E.C.2.3.2.13) é também conhecida como proteína-glutamina- γ -glutamyltransferase e catalisa a reação geral



20 Q-C(O)-NH₂ (receptor de amina) pode representar um resíduo de glutamina contendo peptídeo e Q'-NH₂ (doador de amina) representa um nucleófilo contendo amina. Alternativamente, Q-C(O)-NH₂ e Q'-NH₂ podem representar um receptor de amina e um peptídeo contendo lisina, respectivamente. Na presente invenção, no entanto, Q-C(O)-NH₂ representa
 25 um resíduo de glutamina contendo hormônio de crescimento e Q'-NH₂ representa um nucleófilo contendo amina, como indicado acima.

Um doador de amina comum *in vivo* é uma lisina ligada a

peptídeo, e a reação acima então dá uma ligação cruzada de peptídeos. O fator de coagulação Fator XIII é uma transglutaminase que efetua a coagulação de sangue quando de ferimentos. Diferentes transglutaminases diferem entre si, por exemplo em que os resíduos de aminoácidos em torno do resíduo de glutamina (ou Gln) são requeridos para a proteína ser um substrato, isto é, diferentes transglutaminases irão ter diferentes peptídeos contendo Gln como substratos dependendo de quais resíduos de aminoácidos são vizinhos ao resíduo de Gln. Este aspecto pode ser explorado se um hormônio de crescimento a ser modificado contém mais do que um resíduo de Gln. Se for desejado conjugar seletivamente o hormônio de crescimento somente em alguns dos resíduos de Gln presentes, esta seletividade pode ser obtida por seleção de uma transglutaminase que somente aceita o resíduo de Gln (s) relevante(s) como substrato. Alternativamente, um ou mais resíduos de aminoácidos próximos de um Gln podem ser alterados, por exemplo, por meio de engenharia genética para modificar a atividade de uma dada transglutaminase para o referido resíduo de Gln. Os resíduos de glutamina podem, como evidente, também ser deletados do hormônio de crescimento ou substituídos com outro aminoácido para obter um hormônio de crescimento com menos ou somente um resíduo de glutamina para conjugar a.

Reconhece-se que se ou não um composto é substrato para uma dada enzima depende, em princípio, das condições de reação, por exemplo o quadro de tempo, a temperatura, etc. Dado tempo suficiente, muitos compostos são normalmente considerados como substratos são, de fato, substratos. Quando é afirmado acima que para uma dada transglutaminase alguns resíduos de Gln podem ser substratos enquanto outros não são, pretende-se indicar que "outros não são" em uma extensão onde a seletividade desejada pode ser ainda obtida. Se um ou mais dos resíduos de Gln, que se deseja deixar não conjugado, são, de fato, um substrato para transglutaminase quando em contato com transglutaminase

durante um período de tempo prolongado, a seletividade pode ser obtida por remoção ou inativação de transglutaminase após um tempo apropriado.

Os exemplos de transglutaminases utilizáveis incluem transglutaminases microbianas, tal como por exemplo os de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* e *Streptomyces griseocarneum* (5 todos descritos em US 5,156,956, que é incorporado aqui por referência), e de *Streptomyces lavendulae* (descrito em US 5,252,469, que é incorporado aqui por referência) e *Streptomyces ladakanum* (JP2003199569, que é incorporado aqui por referência). Deve-se notar que membros do gênero anterior *Streptoverticillium* são agora incluídos no gênero *Streptomyces* (10 (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137, 1831-1892 (1991)). Outras transglutaminases microbianas utilizáveis foram isoladas de *Bacillus subtilis* (descrito em US 5,731,183, que é incorporado aqui por referência) e de vários Myxomycetes. Outros exemplos de transglutaminases microbianas utilizáveis são as descritas em WO 96/06931 (por exemplo transglutaminase de *Bacillus* 15 *lydicus*) e WO 96/22366, ambas sendo incorporadas aqui por referência. As transglutaminases não microbianas utilizáveis incluem transglutaminase de fígado de porquinho-da-índia, e transglutaminases de várias fontes marinhas como o peixe *Pagrus major* (descrito em EP-0555649, que é incorporado aqui por referência), e a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (descrito em US 20 5,736,356, que é incorporado aqui por referência).

Em uma forma de realização, o resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento a ser PEGuilado é hormônio de crescimento humano (hGH), que é também conhecido como somatotropina humana. Variantes diferentes de hGH existem, como descrito por exemplo na 25 base de dados pública SwissProt. Ele compreende a peptídeo de sinal de 26 aminoácidos e um peptídeo maduro de 191 aminoácidos.

Em uma forma de realização, hGH tem uma seqüência de aminoácidos como mostrada em SEQ ID No. 1 aqui (também conhecida como

22K-hGH).

Em uma forma de realização, o hGH é 20 kDa hGH (ou 20K-hGH) como descrito em J.Clin.Endocrin.Metabol. 89, 1562-1571 (2004) e Endocrine J., 47, S49-S52 (2000). 20 kDa hGH é um hGH com um peso molecular de 20 kDa (20K-hGH), que é secretado pela glândula pituitária anterior como uma variante de emenda (emenda alternativa de exon 3) e registrado como perfazendo aproximadamente 5-10% de hGH no plasma da circulação (Baumann, Endocr. Rev. 12, 424-449 (1991)). 20K-hGH falta 15 aminoácidos como comparado com 22K-hGH (resíduos 32-46). 22K-hGH é atualmente aprovado e usado em terapias de substituição hGH e farmacologia, no entanto 20K-hGH nunca foi usado nestas terapias. 20K-hGH é um agonista completo para a promoção do crescimento em ratos hipofisectomizados e ratos anões, assim tão potente como 22K-hGH (Wada et al., Mol. Cellu. Endocr. 113, 99-107 (1997), Ishikawa et al., Growth Horm. IGF Res. 10, 199-206 (2000)). Além disso, o efeito osteoanabólico de 20K-hGH em células de osteoblastos humanos é também equipotente para o de 22K-hGH. Em um estudo de infusão de 24 horas, de três ramificações, (em ratos) usando 20K-hGH recombinante, 22K-hGH e um grupo de controle, 20K-hGH não teve efeito significativo sobre a taxa de infusão de glucose (GIR) em passos euglicêmicos, como comparado com o controle. Em contraste, 22K-hGH significativamente abaixou o GIR comparado com ambos 20K-hGH e o grupo de controle (Takahashi et al., Growth Horm. IGF Res. 11, 110-116 (2001)). Assim, um pico menor (uniforme) de 20K-hGH de perfil no plasma parece ser de menor diabetogenicidade e com uma ação antagonizante de insulina reduzida do que 22K-hGH. Além disso, em rato normal, 20K-hGH mostrou uma menor potência em causar retenção de urina (formação de edema) do que 22K-hGH (Satozawa et al., Growth Horm. IGF Res. 10, 187-192 (2000)). Um produto de hormônio de crescimento de longa duração tem um perfil no plasma próximo do obtido usando uma infusão. Assim, usando um derivado

de 20K-hGH pode oferecer uma farmacologia similar desejada, como um derivado de 22K-hGH, no entanto com um perfil de efeitos adversos melhorado. Além disso, 20K-hGH pode ter uma possibilidade melhorar de dar um produto de hormônio de crescimento de longa duração como ele tem uma
5 meia-vida no plasma mais longa em 30% herdada em humanos comparado com um 22K-hGH. A depuração reduzida é devido, como se acredita, a uma depuração mediada por receptor (Leung et al., Am. J. Fisiol Endocr. Metab. 283, 836-843 (2002)). Além disso, em baixa concentração (0,1 nM) 20K-hGH demonstrou ser aproximadamente três vezes mais eficiente do que 22K-hGH
10 para induzir a expressão de IGF-1 (Yoshizato et al., Endocr. J. 47, 37-40 (2000)) – novamente indicando um melhor perfil para um produto de hormônio de crescimento de longa ação.

Em uma forma de realização, o hormônio de crescimento a ser
PEGuilado é uma variante de hGH, em que uma variante é entendida como
15 sendo o composto obtido por substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na seqüência do hGH com outro aminoácido natural ou não natural; e/ou por adição de um ou mais aminoácidos naturais ou não naturais para uma seqüência de hGH; e/ou por deleção de um ou mais resíduos de aminoácido da seqüência do hGH, em que qualquer uma das destas etapas
20 pode opcionalmente se seguida por outra derivatização de um ou mais resíduos de aminoácidos, por exemplo por peguilação resultantes em uma variante de hormônio de crescimento di- ou multi-peguilado. Em particular, estas substituições são conservativas no sentido em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido do mesmo grupo,
25 isto é por outro resíduo de aminoácido com propriedades similares. Aminoácidos podem ser convenientemente divididos nos seguintes grupos com base em suas propriedades: aminoácidos básicos (tal como arginina e lisina), aminoácidos ácidos (tal como ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (tal como glutamina, histidina, cisteína e asparagina),

aminoácidos hidrofóbicos (tal como leucina, isoleucina, prolina, metionina e valina), aminoácidos aromáticos (tal como fenilalanina, triptofano, tirosina) e aminoácidos pequenos (tal como glicina, alanina, serina e treonina).

Em uma forma de realização, o hGH é um hGH em que o
 5 resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido. Em uma forma de realização, o hGH é um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido. Em uma forma de realização, o hGH é um hGH, em
 10 que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido, e onde um resíduo de glutamina está presente em outra posição no hormônio de crescimento. Em uma outra forma de realização, referido
 15 outro aminoácido é asparagina.

Em uma forma de realização, o resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento a ser PEGuilado tem pelo menos 80%, tal como pelo menos 85%, tal como pelo menos 90%, tal como pelo menos 95% tal como pelo menos 98% identidade com hGH. Em uma forma
 20 de realização, referidas identidades para hGH são copuladas a pelo menos 20%, tal como pelo menos 40%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 80% dos hormônio de crescimento atividade de hGH como determinado em teste I aqui.

O termo "identidade " como conhecido na técnica, refere-se a
 25 uma relação entre as seqüências de duas ou mais proteínas, como determinado por comparação das seqüências. Na técnica, "identidade " também significa o grau de parentesco de seqüência entre proteínas, como determinado pelo número de correspondências entre os cordões de dois ou mais resíduos de aminoácidos. "Identidade " mede a percentagem de correspondências

idênticas entre a menor de duas ou mais seqüências com alinhamentos de espaços (se presentes) dirigidos a um modelo matemático particular modelo ou programa de computador (isto é, "algoritmos"). Identidade de proteínas relacionadas pode ser prontamente calculada por métodos conhecidos. Estes

5 métodos incluem, mas não são limitados aos 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; *Computador Analysis of Sequence Data*, Parte 1, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey,

10 1994; *Sequence Analysis of 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 et al., *SIAM J. Aplicada Math.*, 48:1073 (1988).

Métodos preferidos para determinar a identidade são

15 projetados para dar a maior correspondência entre as seqüências testadas. Os métodos para determinar a identidade são descritos em programas de computador disponíveis. Os métodos de programas de computador preferidos para determinar a identidade entre duas seqüências incluem o pacote de programa GCG, incluindo GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.*, 12:387

20 (1984); Genetics Computador Group, University de Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, e FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). O programa BLASTX é publicamente disponível do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al.,

25 supra). O algoritmo Smith Waterman bem conhecido também pode ser usado para determinar a identidade.

Por exemplo, usando o algoritmo de computador GAP (Genetics Computador Grupo, University de Wisconsin, Madison, Wis.), duas proteínas para as quais a identidade de seqüência percentual deve ser

determinada são alinhadas para uma correspondência ótima dos aminoácidos respectivos (o intervalo de correspondência", como determinado pelo algoritmo). Uma penalidade de abertura de espaço (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 para cada correspondência de aminoácido perfeita pela matriz de comparação particular) e uma penalidade de extensão de tamanho (que é geralmente {fração (1/10)} vezes a penalidade de abertura de espaço), assim como uma matriz de comparação como PAM 250 ou BLOSUM 62 são usados em
 5
 10
 conjunção com o algoritmo. Uma matriz de comparação padrão (ver Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978) para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para a matriz de comparação BLOSUM 62) é também usada pelo algoritmo.

15 Os parâmetros preferidos para uma comparação de seqüência de proteína incluem os seguintes: Algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol, 48:443-453 (1970); Matriz de comparação: BLOSUM 62 de Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 (1992); Penalidade de espaço: 12, penalidade de comprimento de espaço: 4, Limiar de similaridade: 0.

20 O programa GAP é utilizável com os parâmetros acima. Os parâmetros acima mencionados são os parâmetros de *default* para comparações de proteínas (junto com sem penalidade para os espaços de extremidade) usando o algoritmo GAP.

25 Deve ser entendido que os hormônios de crescimento acima discutidos a serem PEGuilados devem compreender pelo menos um resíduo de glutamina. O termo "resíduo de glutamina" como usado aqui também inclui um análogo de resíduo de glutamina apropriado para transaminação. Os análogos de resíduo de glutamina apropriados incluem, mas não são limitados a, análogos de resíduo de glutamina parcialmente fluorados, alquilados, ou

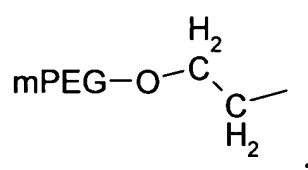
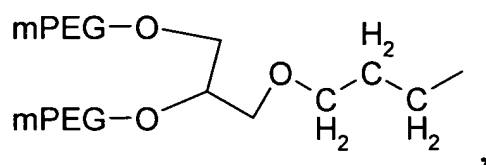
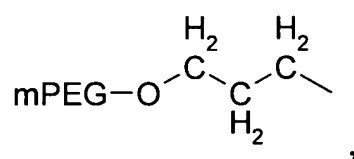
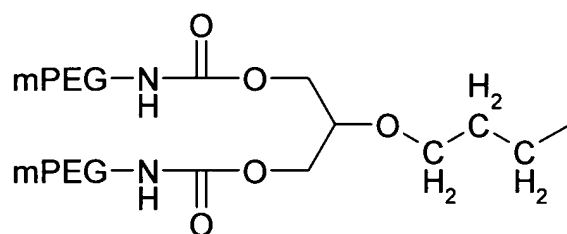
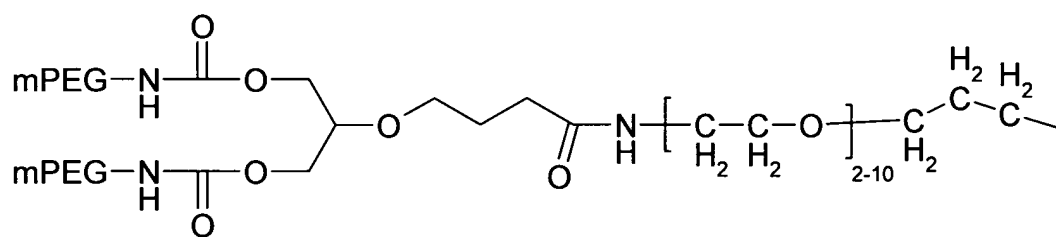
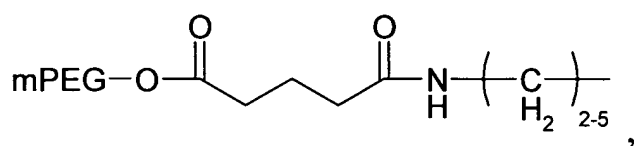
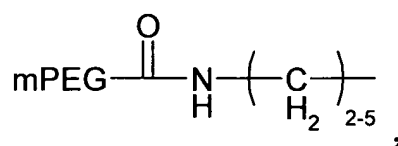
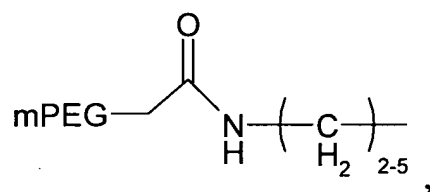
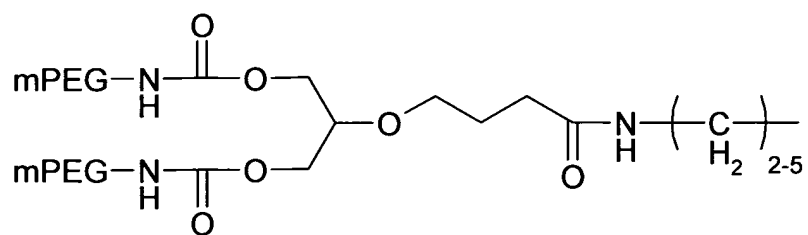
deuterados, ou um homólogo de um resíduo de glutamina, isto é um composto resultante de inserção formal de um, dois ou mais grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) em uma ligação C-C, C-H, ou C-N- de glutamina.

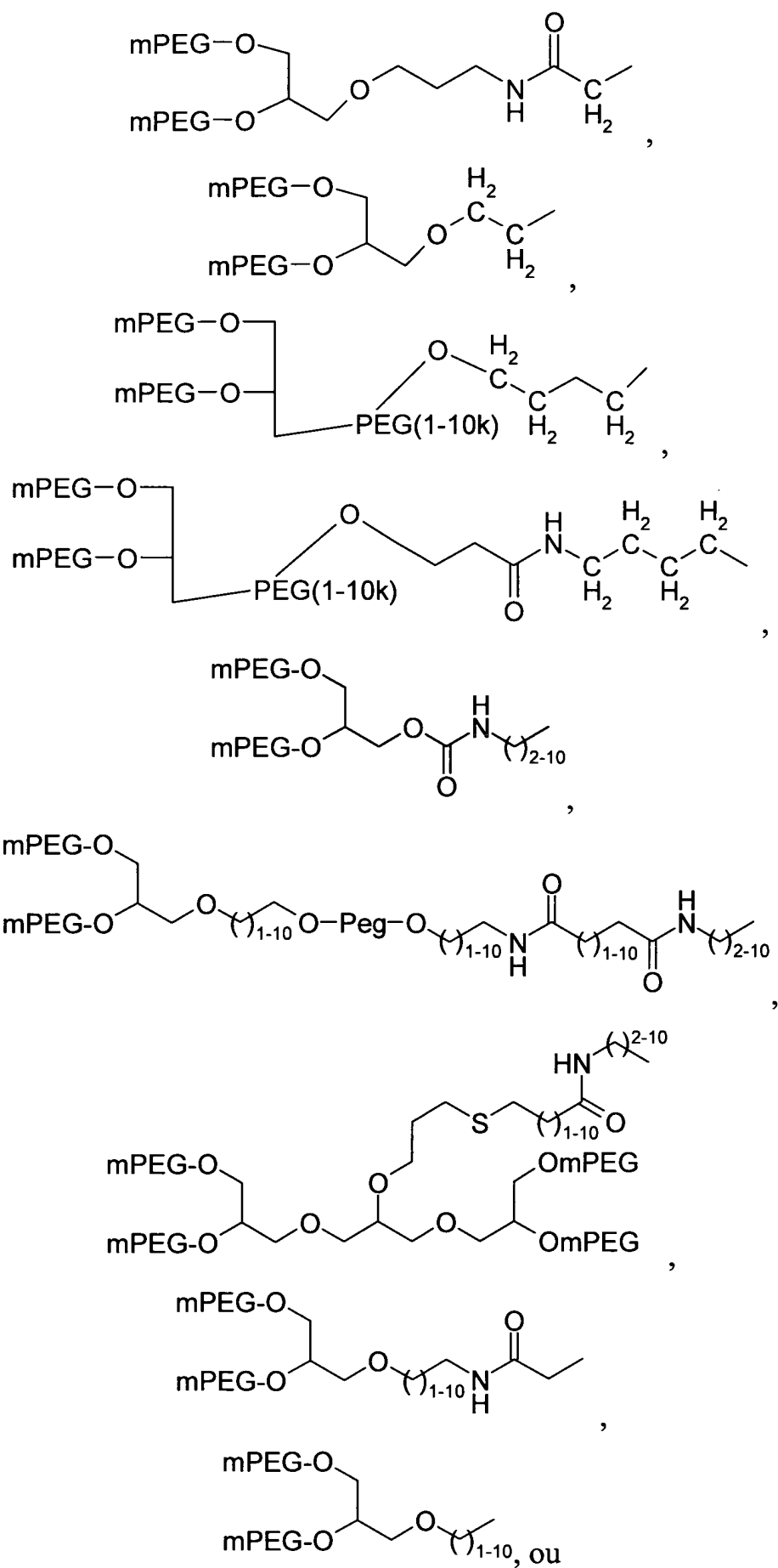
O hormônio de crescimento pode ser obtido por métodos sintéticos de proteína padrão, ou hormônio de crescimento pode ser obtido por transfecção de uma célula hospedeira apropriada com um DNA codificando o hormônio de crescimento de interesse. Isto está dentro dos conhecimentos do versado. O hormônio de crescimento peguilaado obtenível pelo uso de um método de acordo com a invenção usado também pode ser derivatizado por outros meios do que a peguilação, se assim desejado. Esta derivatização adicional pode ser realizada antes, durante ou após uso das etapas do método da invenção. O versado na técnica saberá determinar o tempo desta derivatização adicional. O hormônio de crescimento usado também pode já ter sido peguilaado em uma ou mais de outras posições além do sítio ou sítios a serem peguilaados usando um método de acordo com a presente invenção.

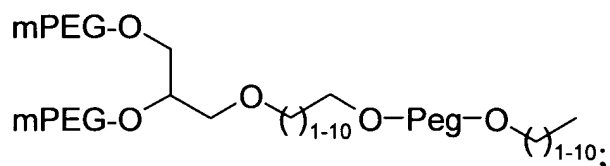
Em uma forma de realização, D representa $-\text{O}-$. Em outra forma de realização, D representa uma ligação única.

O ligador R provê um espaçamento apropriado da amina do nucleófilo e grupo funcional ou o grupo funcional latente a ser incorporado em hormônio de crescimento. Em uma forma de realização, R representa $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ou $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$. Em uma forma de realização, R representa C_{1-6} alquilenos. Em uma forma de realização, R representa C_{1-3} alquilenos. Em uma forma de realização, R representa metileno, etileno ou propileno. Em uma forma de realização, R metileno ou propileno.

Em uma forma de realização, Z representa

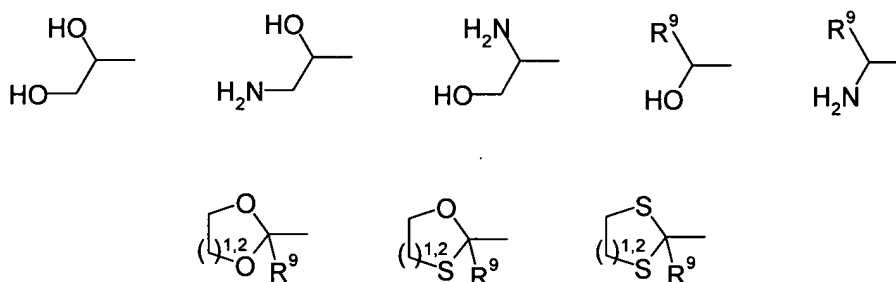






em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa.

Deve ser entendido que o funcional grupo compreendido em X pode ser latente no sentido de que ele precisa ser ativado antes da reação com Y-Z. Por meio de exemplo, X pode compreender uma porção que quando da reação com um reagente apropriado é transformada em um aldeído ou uma cetona. Exemplos de destas porções incluem



em que R^9 representa H, C_{1-6} alquila, arila ou heteroarila.

Exemplos particulares incluem metila, etila e propila. Referidas porções podem ser transformadas em um aldeído ou cetona por oxidação com um agente apropriado, tal como por exemplo periodato, ou por hidrólise com ácido aquoso, opcionalmente na presença de um catalisador, tal como sais de cobre, prata ou mercúrio.

No presente contexto, o termo “arila” destina-se a indicar um radical de anel aromático homocíclico ou um sistema de anel fundido homocíclico em que pelo menos um dos anéis são aromáticos. Grupos arila típicos incluem fenila, bifenilila, naftila, tetralinila e outros.

O termo “heteroarila”, como usado aqui, sozinho ou em combinação, refere-se a um radical de anel aromático com por exemplo 5 a 7 átomos no anel, ou sistema de radical de anel aromático fundido com por exemplo de 7 a 18 átomos no anel, em que pelo menos um anel é aromático e

contém um ou mais heteroátomos como átomos no anel selecionado dentre heteroátomos nitrogênio, oxigênio, ou de enxofre, em que N-óxidos e monóxidos de enxofre e dióxidos de enxofre são substituições de heteroaromáticos permissíveis. Exemplos incluem furanila, tienila, tiofenila, pirrolila, imidazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolila, tiazolila, oxazolila, isoxazolila, oxadiazolila, tiadiazolila, isotiazolila, piridinila, piridazinila, pirazinila, pirimidinila, quinolinila, isoquinolinila, benzofuranila, benzotiofenila, indolila, e indazolila, e outros.

Deve ser também entendido que X e Y devem ser complementares no sentido que eles devem ser capazes de reagir um com o outro para formar uma ligação oxima. Isto significa que se X é um (ou pode ser ativado para ser um) aldeído ou cetona, então Y deve ser um aminóxi. Se X for um aminóxi, então Y deve ser um aldeído ou uma cetona. Se Y é um aldeído ou uma cetona, então X deve ser um aminóxi. Se Y é um aminóxi, então X deve ser (ou deve ser ativado para) um aldeído ou uma cetona.

Exemplos particulares do composto de fórmula [II] incluem 1,3-diaminoóxi propano e 1,3-diamino-2-propanol. Se se usar o último composto, o grupo aldeído latente tem de ser oxidado, por exemplo por meio de periodato, a ser convertido em um aldeído.

Em uma forma de realização, Y representa $-O-NH_2$ e X representa um aldeído ou um grupo latente, que pode ser ainda reagido para formar um aldeído. Em uma forma de realização, Y representa $-O-NH_2$ e X representa uma cetona ou um grupo latente que pode ser ainda reagido para formar uma cetona. Em uma forma de realização, o composto de fórmula [II]



[II]

representa 1,3-diamino-2-propanol, e Y representa $-O-NH_2$.

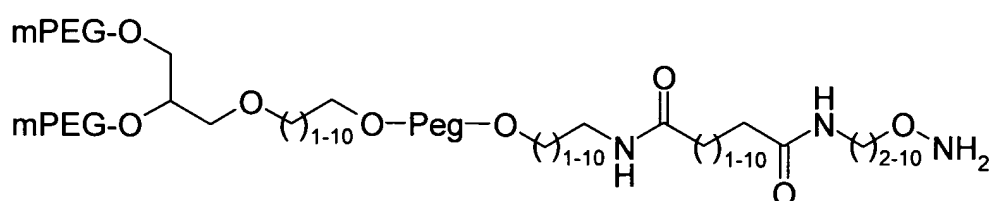
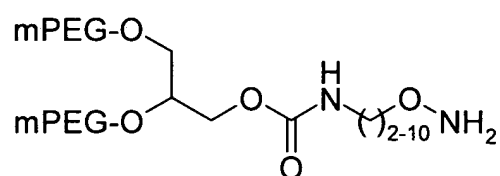
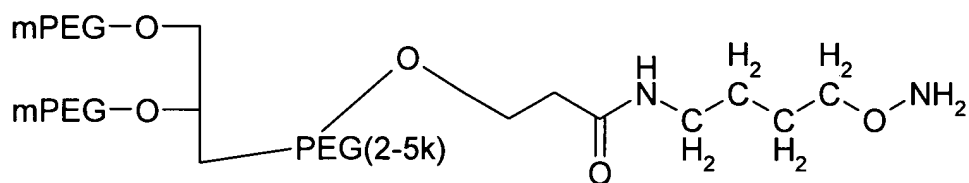
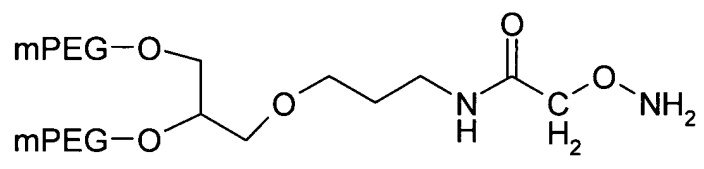
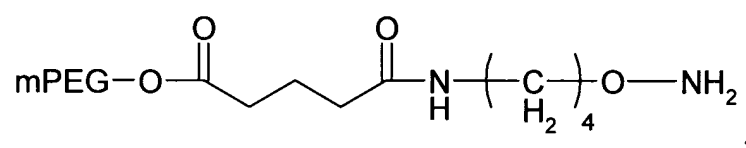
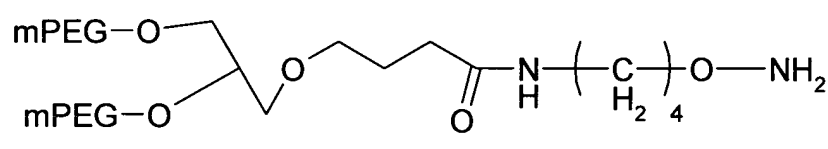
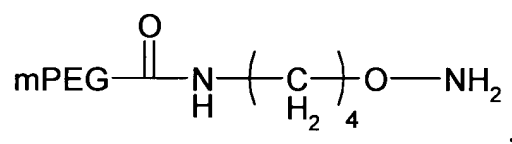
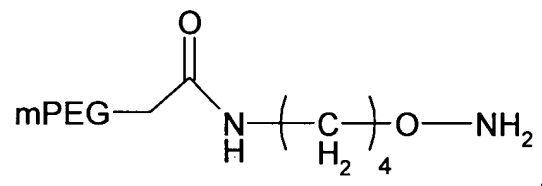
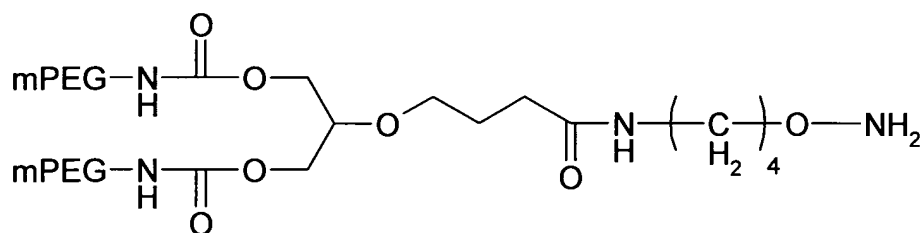
Em uma outra forma de realização, o composto de fórmula

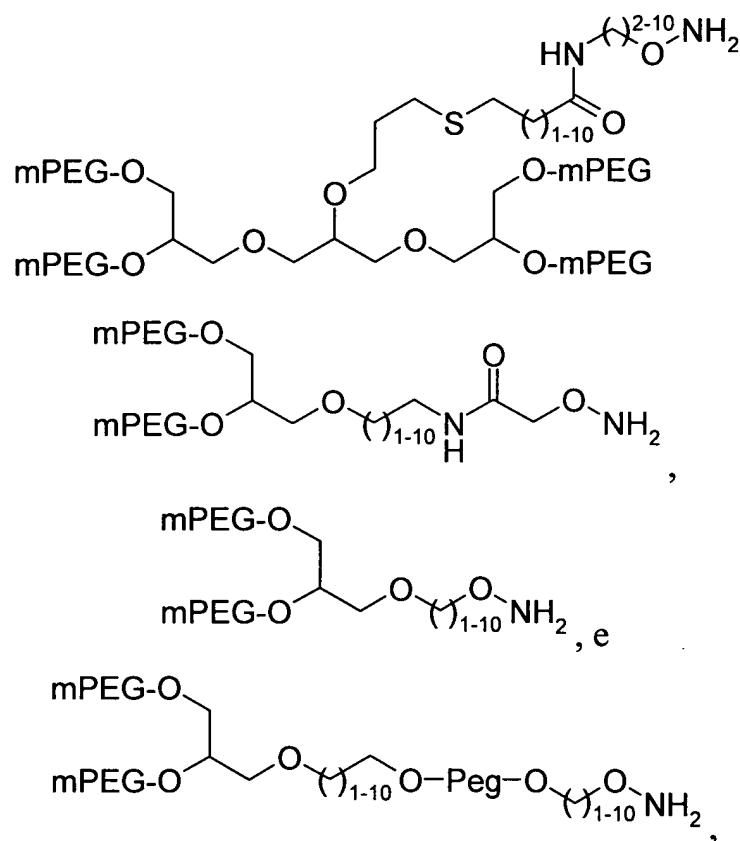
[IV]



[IV]

representa um composto selecionado dentre





em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

Em uma forma de realização, Y representa um aldeído e X representa -O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂. Em uma outra forma de realização, o composto de fórmula [II]



[II]

representa 1,3-diaminoóxi propano, e Y representa um aldeído.

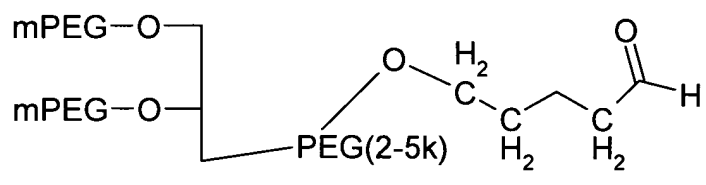
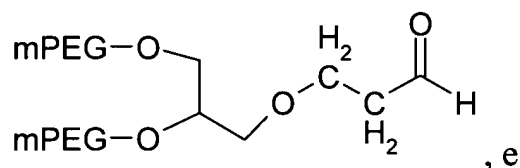
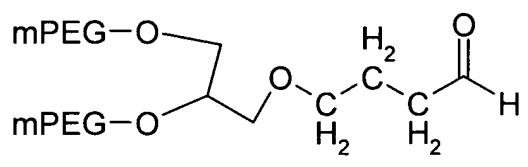
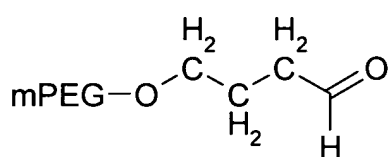
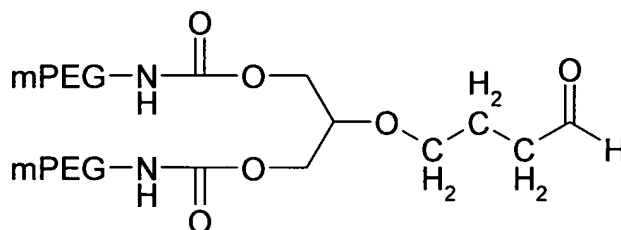
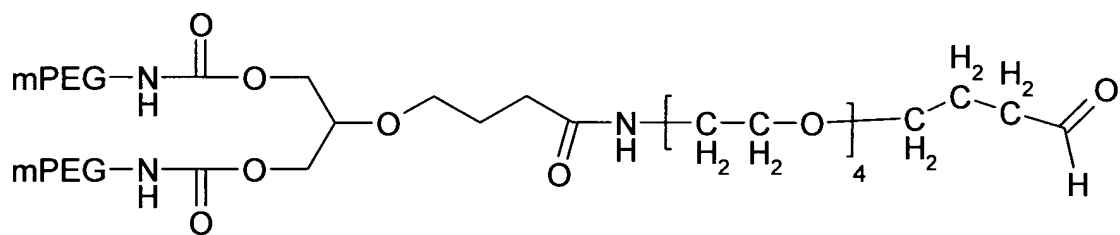
Em uma outra forma de realização, o composto de fórmula

10 [IV]



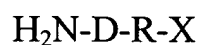
[IV]

representa um composto selecionado dentre



em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

Em uma forma de realização, Y representa uma cetona e X representa -O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂. Em uma outra forma de realização, o composto de fórmula [II]



[II]

representa 1,3-diaminoóxi propano, e Y representa uma

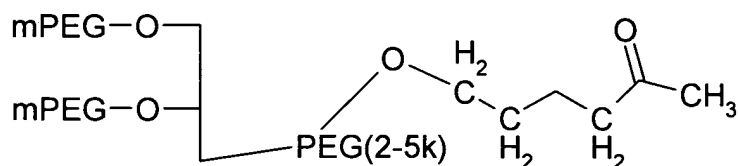
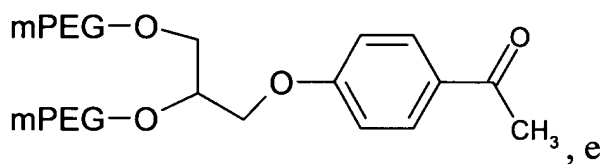
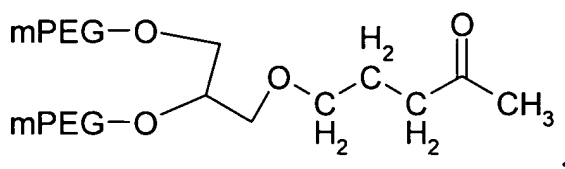
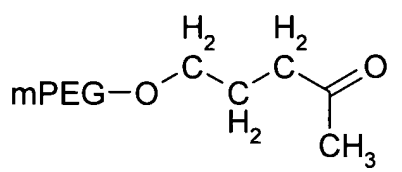
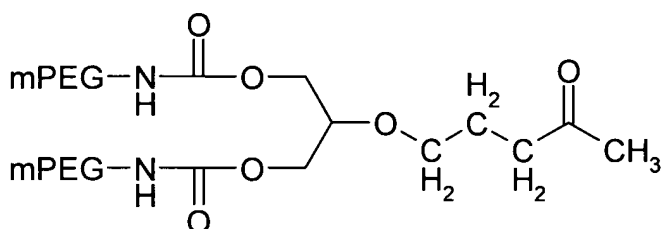
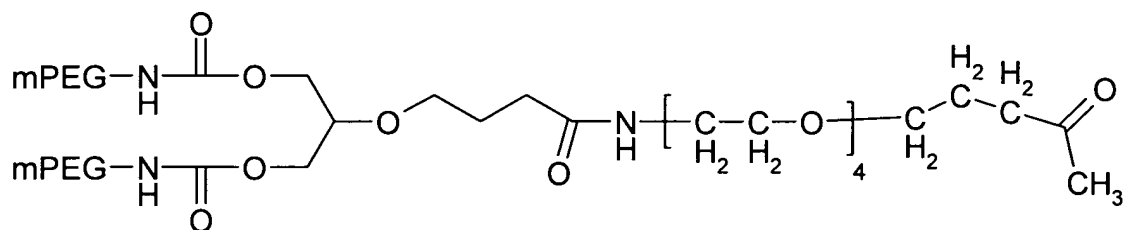
cetona.

Em uma outra forma de realização, o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre



5

em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

Os compostos de fórmula [IV] são comercialmente

disponíveis, por exemplo das empresas ShearWater ou NOF, ou eles podem ser prontamente obtidos de compostos comercialmente disponíveis quando de uma simples modificação química.

Os compostos de fórmula V podem propriedades
5 farmacológicas melhoradas ou comparadas com um hormônio de crescimento não conjugado correspondente, também referido como o hormônio de crescimento parental. Assim, em uma forma de realização, a presente invenção refere-se a um método de modificar as propriedades farmacológicas de hormônio de crescimento, o método compreendendo fixar PEG ao referido
10 hormônio de crescimento de acordo com métodos da presente invenção. Exemplos destas propriedades farmacológicas incluem meia-vida funcional *in vivo*, imunogenicidade, filtração renal, proteção de protease e ligação de albumina.

O termo “meia vida funcional *in vivo*” é usado em seu
15 significado normal, isto é, o tempo em que 50% da atividade biológica do hormônio de crescimento ou hormônio de crescimento conjugado ainda está presente no órgão do corpo/ marcação, ou o tempo em que a atividade do hormônio de crescimento ou conjugado de hormônio de crescimento é 50% de seu valor inicial. Como uma alternativa para determinar a meia vida
20 funcional *in vivo*, “meia-vida no plasma *in vivo*” pode ser determinada, isto é, o tempo em que 50% dos hormônio de crescimento ou conjugado de hormônio de crescimento circulam no plasma ou corrente sanguínea antes de serem depurados. Determinação de meia-vida no plasma é com frequência mais simples do que a determinação da meia vida funcional e a magnitude de
25 meia-vida no plasma é geralmente uma boa indicação da magnitude de meia vida funcional *in vivo*. Termos alternativos para meia-vida no plasma incluem meia-vida no soro, meia-vida circulante, meia-vida circulatória, depuração no soro, depuração no plasma, e meia-vida de depuração.

O termo “aumentado” como usado em conexão com a meia

vida funcional *in vivo* ou meia-vida no plasma é usado para indicar que uma meia-vida relevante do conjugado de hormônio de crescimento é estatisticamente significativamente aumentado com relação à do hormônio de crescimento parental, como determinado sob condições comparáveis. Por exemplo, a meia-vida relevante pode ser aumentada por pelo menos cerca de 25%, tal como por pelo menos cerca de 50%, por exemplo, por pelo menos cerca de 100%, 150%, 200%, 250%, ou 500%. Em uma forma de realização, os compostos da presente invenção demonstram um aumento em meia-vida de pelo menos cerca de 5 h, preferivelmente pelo menos cerca de 24 h, mais preferivelmente pelo menos cerca de 72 h, e o mais preferivelmente pelo menos cerca de 7 dias, relativo à meia-vida do GH parental.

A medida de meia vida *in vivo* no plasma pode ser realizada em vários modos como descrito na literatura. Um aumento em meia-vida *in vivo* no plasma pode ser quantificado como uma diminuição em depuração (CL) ou como um aumento em tempo de residência médio (MRT). Hormônio de crescimento conjugado da presente invenção para o qual o CL é diminuído a menos do que 70%, tal como menos do que 50%, então menos do que 20%, tal como menos do que 10% dos CL do hormônio de crescimento parental, como determinado em um teste apropriado é referido como tendo uma meia vida *in vivo* no plasma aumentada. Hormônio de crescimento conjugado da presente invenção para o qual MRT é aumentado em mais do que 130%, tal como mais do que 150%, tal como mais do que 200%, tal como mais do que 500% do MRT do hormônio de crescimento parental em um teste apropriado é referido como tendo uma meia vida *in vivo* no plasma aumentada. Depuração e tempo de residência médio podem ser avaliados em estudos farmacocinéticos padrões usando animais de teste apropriados. O versado na técnica saberá escolher um animal de teste apropriado para uma dada proteína. Os testes em humanos, como evidente, representam o teste final. Os animais de teste apropriados incluem ratos machos Sprague-Dawley,

camundongos e macacos cinomólogo. Tipicamente, os camundongos e ratos são injetados em um bolo subcutâneo único, enquanto os macacos podem ser injetados em um bolo subcutâneo único ou uma dose iv única. A quantidade injetada depende do animal de teste. Subseqüentemente, as amostras de sangue são tomadas durante um período de um a cinco dias, como apropriado para a avaliação de CL e MRT. As amostras de sangue são convenientemente analisadas por técnicas ELISA.

O termo “Imunogenicidade” de um composto refere-se à capacidade do composto, quando administrado a um humano, elicitar uma resposta imune deletéria, seja humoral, celular, ou ambas. Em qualquer subpopulação humana, podem existir indivíduo que demonstram sensibilidade para as proteínas particulares administradas. Imunogenicidade pode ser medida por quantificação da presença de anticorpos de hormônio de crescimento e/ou células T respondentes a hormônio de crescimento em um indivíduo sensível, usando métodos convencionais conhecidos na técnica. Em uma forma de realização, o GH conjugado da presente invenção demonstra 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 o mais preferivelmente pelo menos cerca de 50%, relativo à imunogenicidade para este indivíduo do GH parental. Em outro aspecto, imunogenicidade pode fazer referência a uma resposta típica em uma população de indivíduos similares, como uma resposta típica em uma população de pacientes em uma experiência clínica.

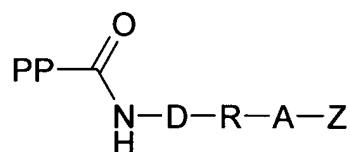
O termo “proteção de protease” ou “protease protegida” como usado aqui destina-se a indicar que o conjugado do hormônio de crescimento da presente invenção é mais resistente a uma peptidase ou proteases no plasma do que é o hormônio de crescimento parental. As enzimas protease e peptidase presentes no plasma são conhecidas como estando envolvidas na degradação de proteínas circulantes, tal como por exemplo hormônios

peptídeo circulantes, tal como hormônio de crescimento.

Resistência de uma proteína à degradação por, por exemplo, dipeptidil aminopeptidase IV (DPP-IV) é determinada pelo seguinte teste de degradação: Alíquotas da proteína (5 nmol) são incubadas a 37°C com 1 µL de dipeptidil aminopeptidase IV purificada correspondendo à uma atividade enzimática de 5 mU durante 10-180 minutos em 100 µL de tampão 0,1 M trietilamina-HCl, pH 7,4. As reações enzimáticas são terminadas pela adição de 5 µL de ácido trifluoroacético a 10%, e os produtos de degradação de proteína são separados e quantificados usando análise HPLC. Um método para realizar esta análise é: as misturas são aplicadas sobre uma coluna de poros largos Vydac C18 (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) 250 x 4,6 mm e eluídas a uma vazão de 1 ml/min com gradientes escalonados lineares de acetonitrila em 0,1 % ácido trifluoroacético (0% acetonitrila durante 3 min, 0-24% acetonitrila durante 17 min, 24-48% acetonitrila durante 1 min) de acordo com Siegel et al., Regul. Pept. 79, 93-102 (1999) e Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 214, 829-35 (1993). Proteínas e seus produtos de degradação podem ser monitorados por sua absorbância a 220 nm (ligações peptídeo) ou 280 nm (aminoácidos aromáticos), e são quantificados por integração de suas áreas de pico relacionadas com os padrões. A taxa de hidrólise de uma proteína por dipeptidil aminopeptidase IV é estimada em tempos de incubação que resultam em menos do que 10% dos peptídeos sendo hidrolisados. A resistência a outras proteases ou peptidases no plasma pode ser determinada em modos similares. Em uma forma de realização, a taxa de hidrólise do conjugado de hormônio de crescimento é menor do que 70%, tal como menor do que 40%, tal como menor do que 10% da do hormônio de crescimento parental.

O componente de proteína mais abundante em sangue circulante de espécies de mamíferos é albumina no soro, que está normalmente presente em uma concentração de aproximadamente 3 a 4,5

—



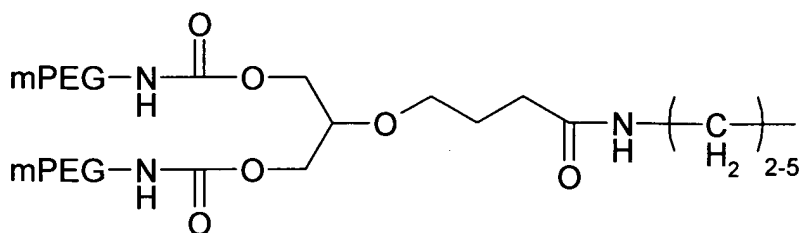
[V]

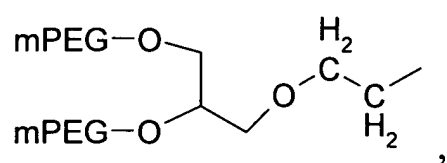
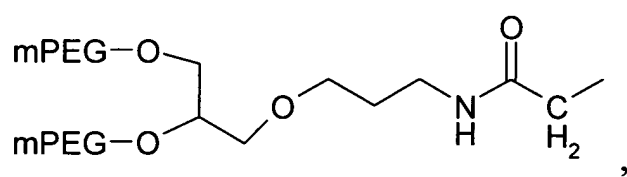
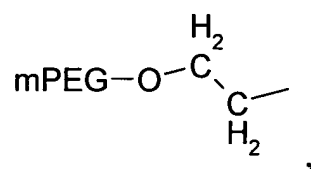
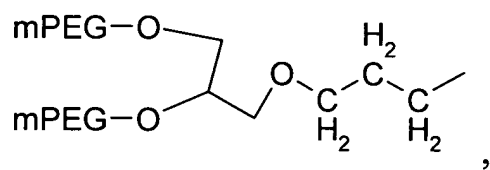
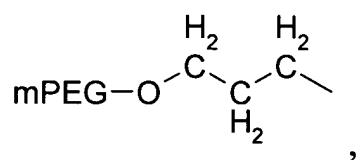
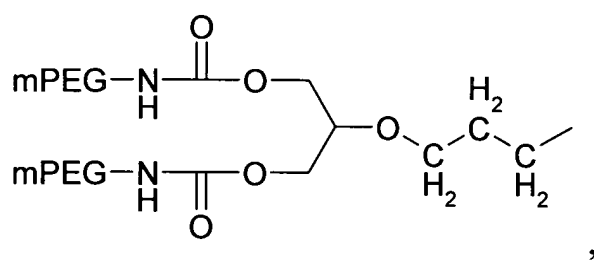
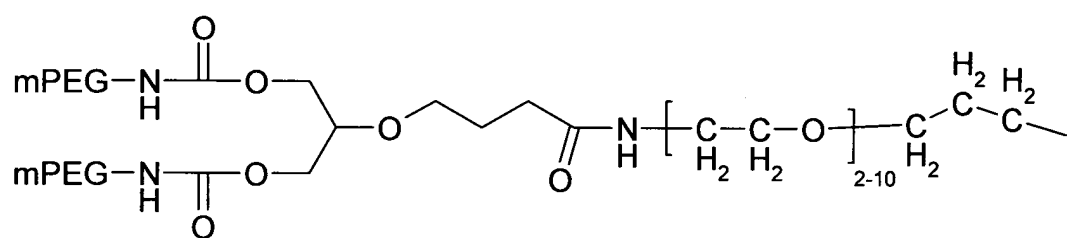
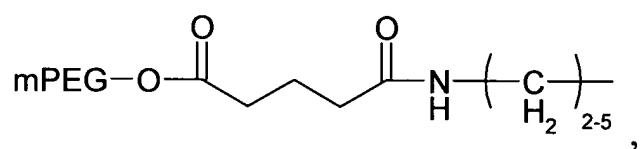
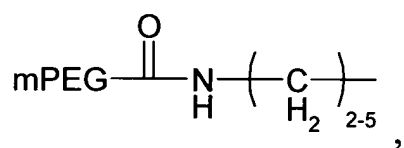
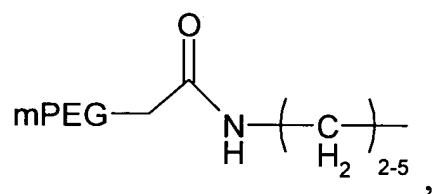
D representa -O- ou uma ligação;

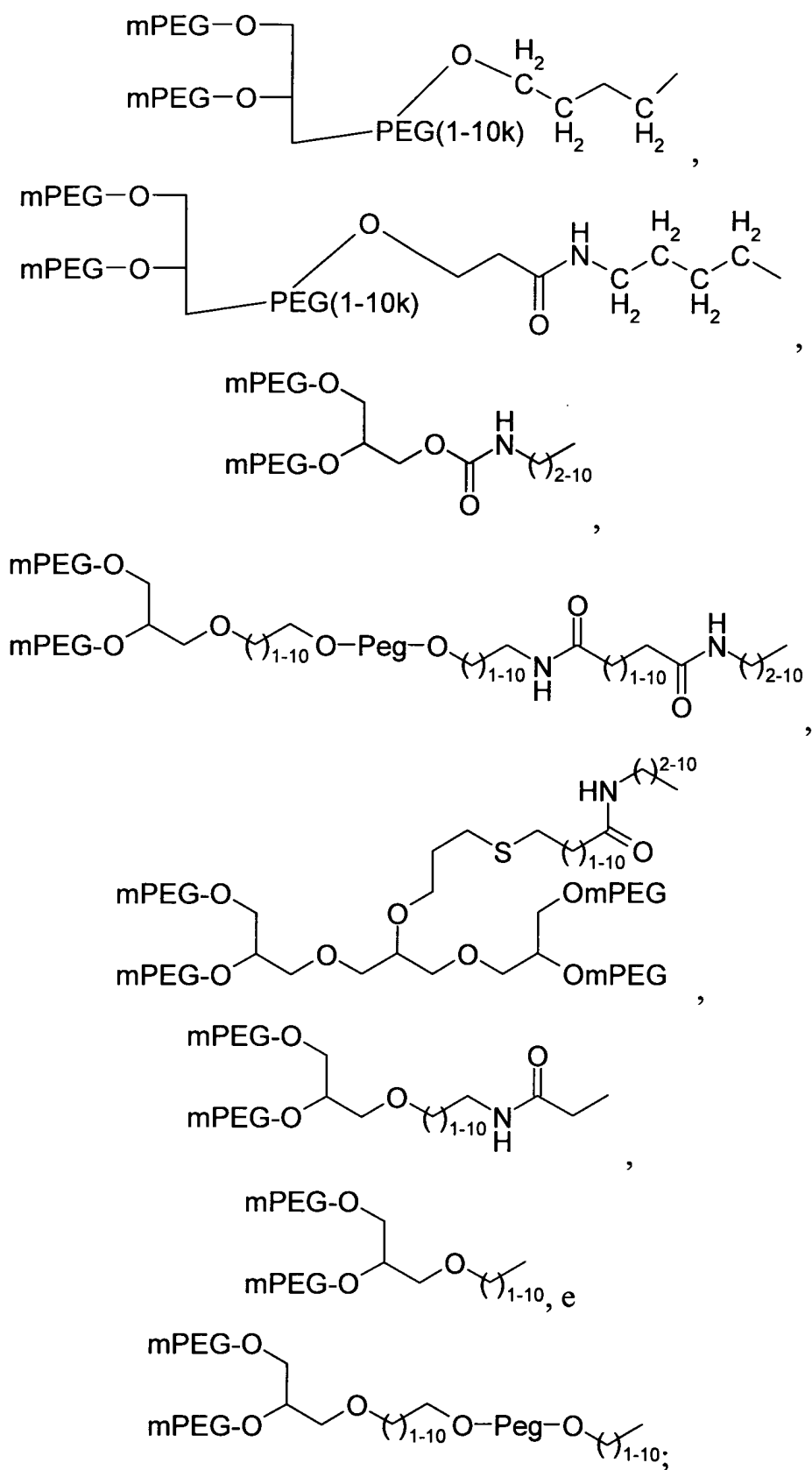
R representa C₁₋₆alquilenos, -(CH₂)₄-CH(NH₂)-CO-NH-CH₂-, -HCOCH₃)-CO-NH-CH₂- ou C₅₋₁₅heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

Z representa uma porção selecionada dentre







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

Em uma forma de realização, o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento.

Em uma forma de realização, a invenção refere-se a um hormônio de crescimento, tal como hGH, que é covalentemente fixado a uma ou mais porções compreendendo PEG, e em particular mPEG, em que referido porção compreendendo PEG é fixada à cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no hormônio de crescimento. Em uma forma de realização, a invenção refere-se a hGHs em que são covalentemente fixados a uma porção compreendendo PEG, e em particular mPEG, em que referida porção compreendendo PEG- é fixada à cadeia lateral do resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40, posição 141 ou posição 40 e 141 em SEQ ID No. 1, desde que não seja

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(4-(4-(mPEG(20k)ilbutanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(1-(hexadecanoil)piperidin-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

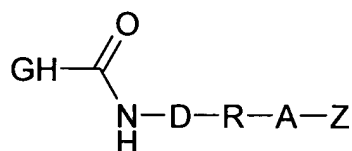
$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(2,6-bis(mPEG(20k)iloxicarbonilamino)hexanoilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(mPEG(30k)iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(mPEG(20k)iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH, ou

$N^{\varepsilon 141}(2-(4-(3-(mPEG(30k)iloxi)propanoilamino)butiloxiimino)etil) hGH$.

Em uma forma de realização, a invenção refere-se a um composto de fórmula [Va]



[Va]

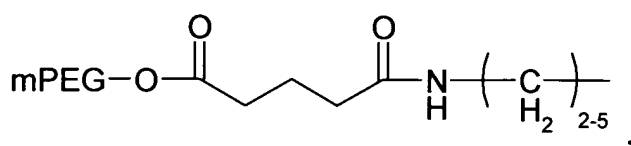
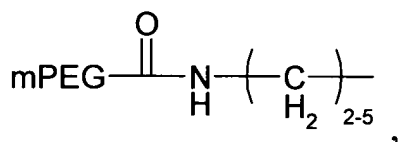
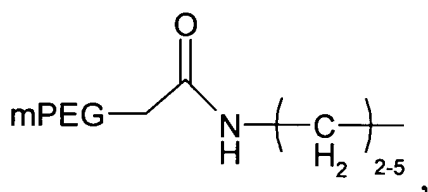
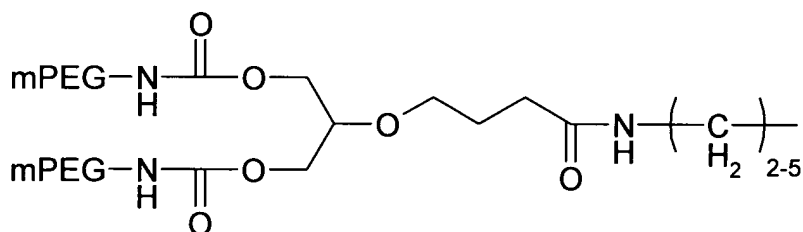
5 em que GH representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento;

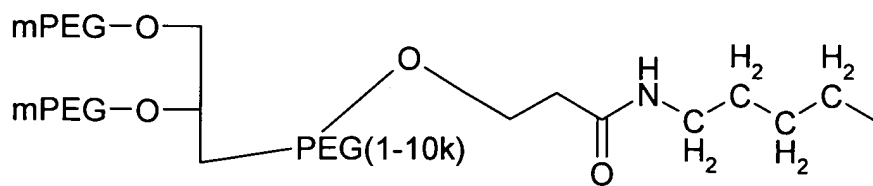
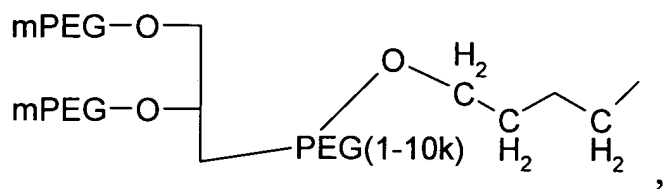
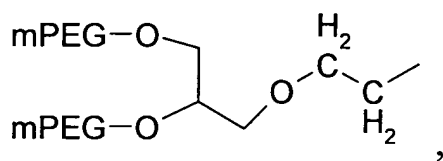
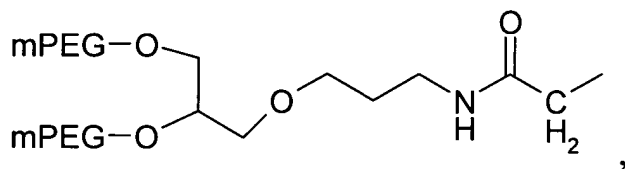
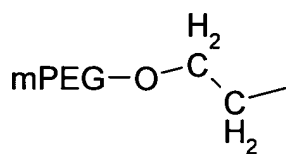
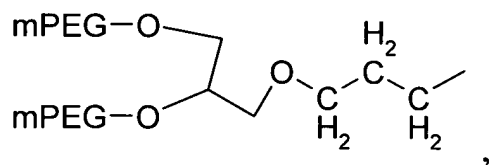
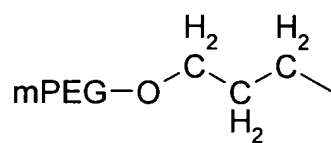
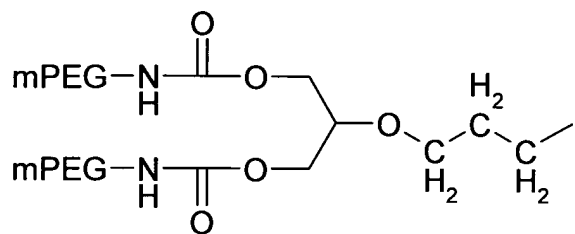
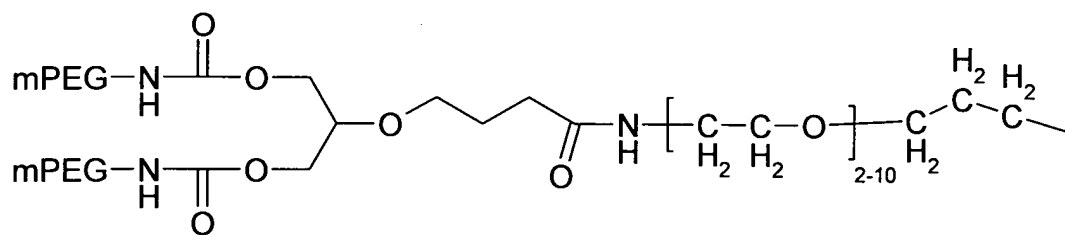
D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação;

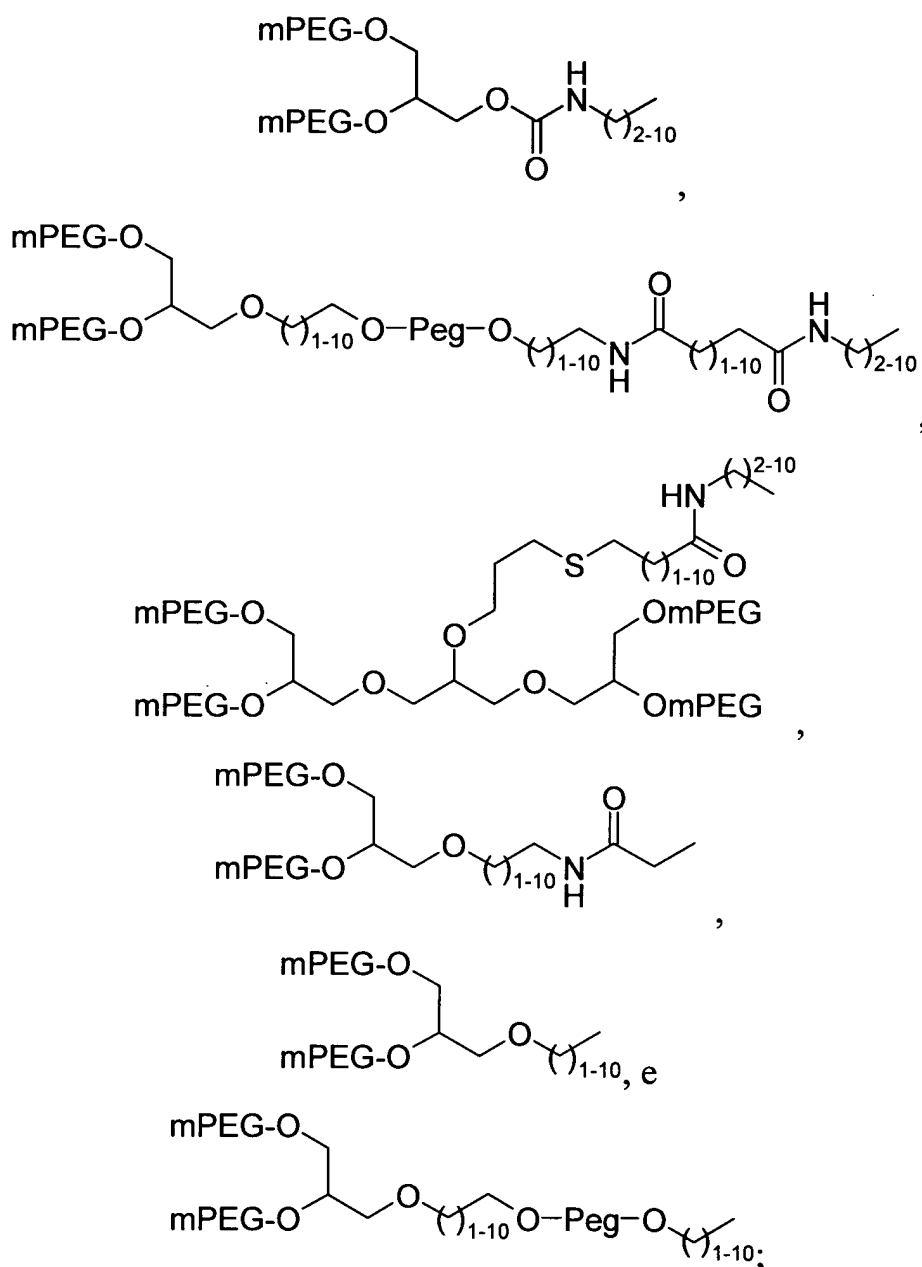
10 R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ou C_{5-15} heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

Z representa uma porção selecionada dentre







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis do

5 mesmo;

desde que se Z é $m\text{PEG}-CH_2-C(=O)-NH-(CH_2)_{2-5}$, então mPEG é 10 kDa mPEG.

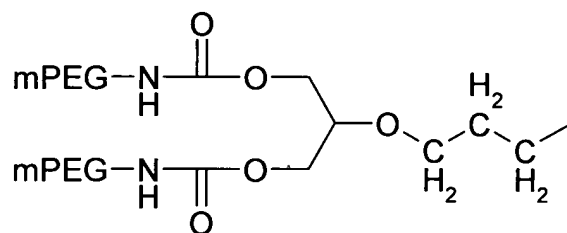
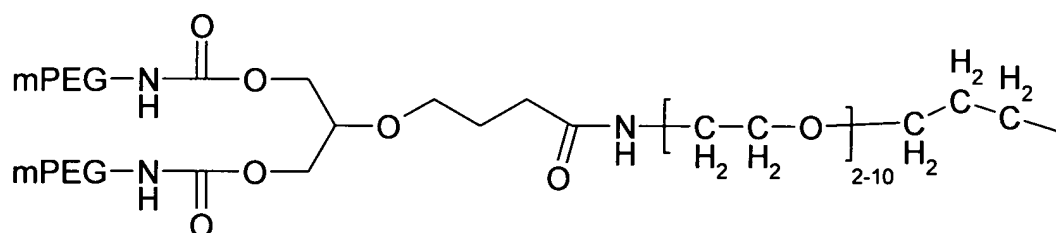
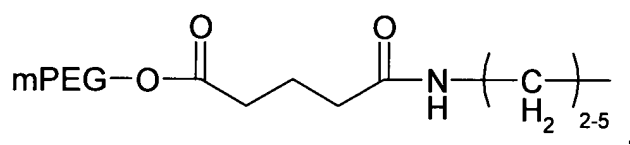
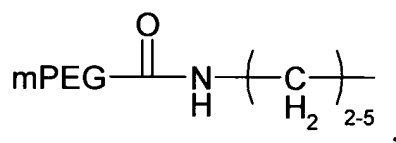
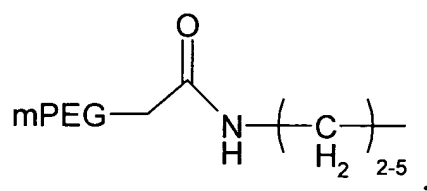
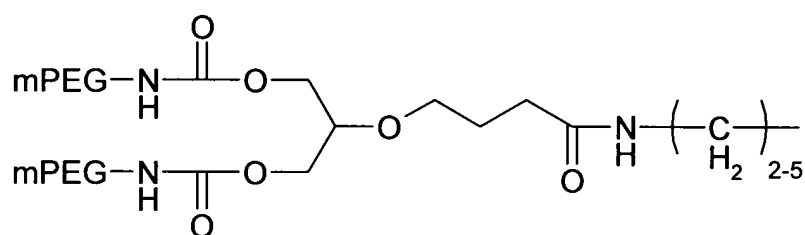
Em uma forma de realização, D representa -O-.

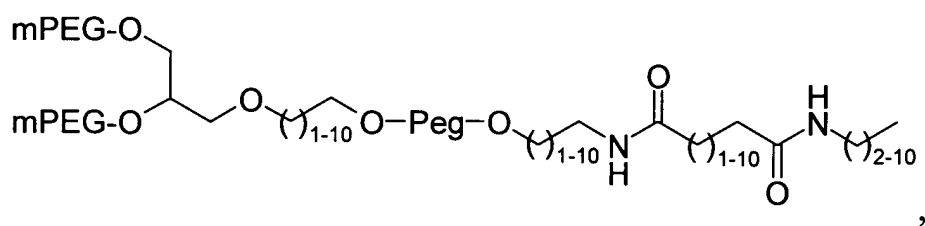
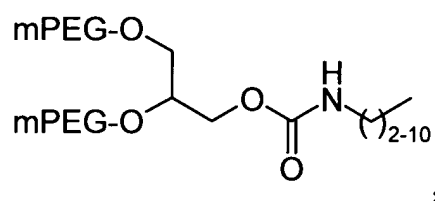
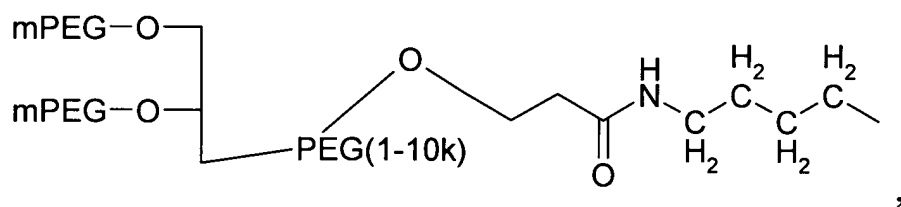
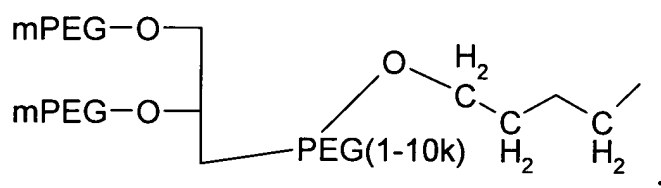
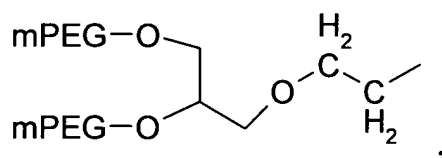
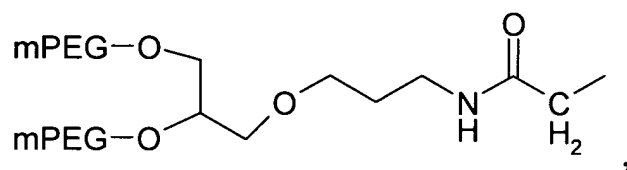
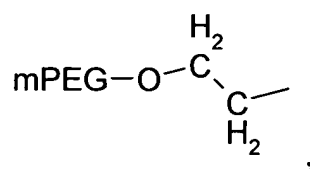
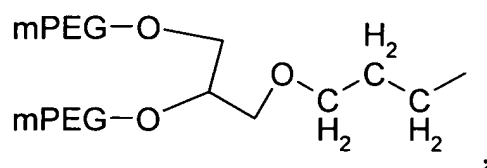
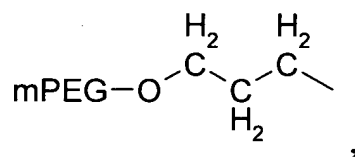
Em uma forma de realização, D representa uma ligação única.

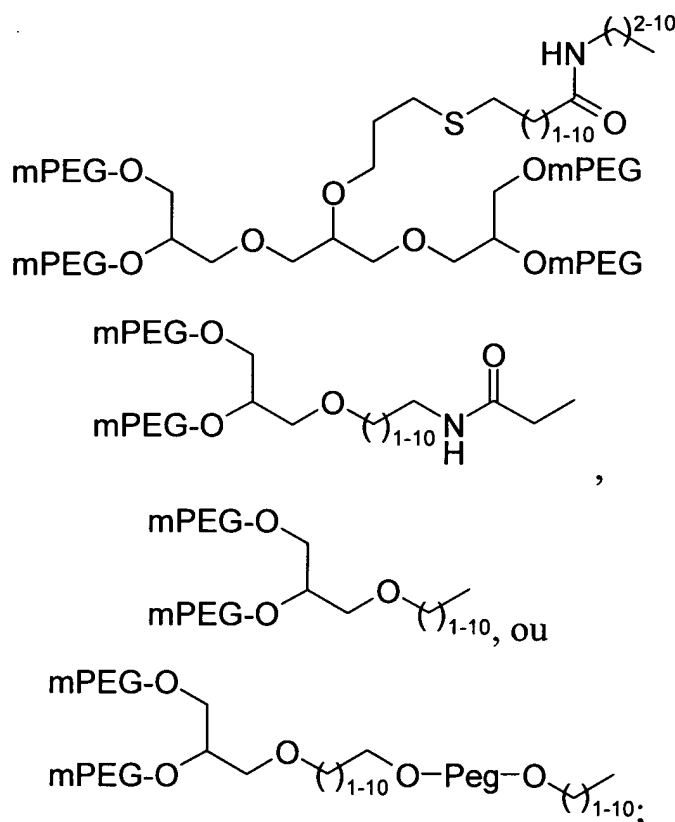
Em uma forma de realização, R representa $-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$ ou $-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$.

Em uma forma de realização, R representa C_{1-6} alquilenos. Em uma outra forma de realização, R representa C_{1-3} alquilenos. Em uma outra forma de realização, R representa metileno, etileno ou propileno. Em uma outra forma de realização, R representa metileno ou propileno.

Em uma forma de realização, Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa.

5 Em uma forma de realização, GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em um hGH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

10 Em uma forma de realização, GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em 20 kDa hGH.

15 Em uma forma de realização, GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de glutamina 40 de hGH. Em particular, referido hGH pode ter sido ainda modificado por deleção de glutamina 141 ou substituição de glutamina 141 com outro aminoácido, e em particular asparagina.

Em uma forma de realização, GH representa o radical obtido

por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de glutamina 141 de hGH. Em particular, referido hGH pode ter sido ainda modificado por deleção de glutamina 40 ou substituição de glutamina 40 com outro aminoácido, e em particular asparagina.

- 5 Em uma forma de realização, GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em uma posição diferente da posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 e diferente da posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à
- 10 posição 40 em SEQ ID No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido, e em particular asparagina.

Particulares exemplos de compostos de fórmula [Va] incluem

- 15 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)-oximino)etil hGH;

- 20 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)-oximino)etil hGH;

- 25 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

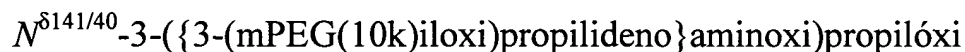
$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi

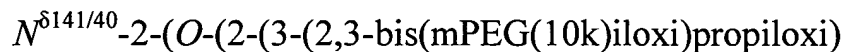
hGH;



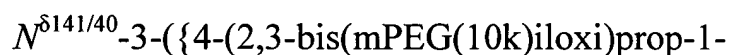
butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



5 hGH;

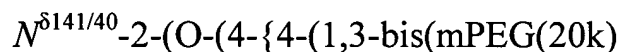


propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

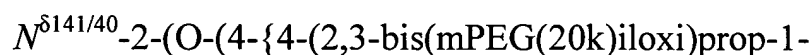
10



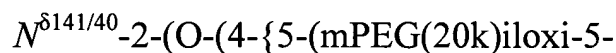
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril} aminobutil)-oximino)etil hGH;



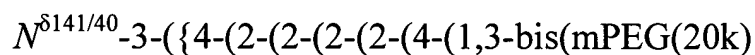
aminobutil)oximino)etil hGH;



15 iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

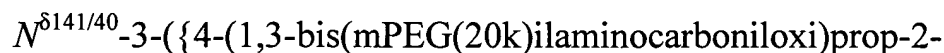


oxopentanoil} aminobutil)oximino)etil hGH;

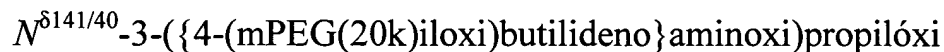


ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

20 butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;



iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

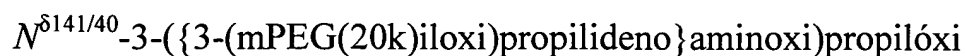


hGH;

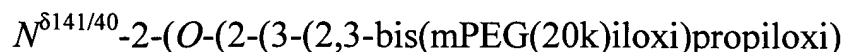
25



butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



hGH;



propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



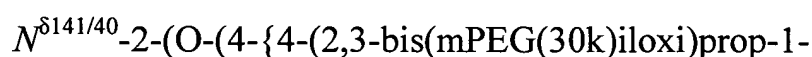
propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



5 prop-2-iloxi)butiril} aminobutil)-oximino)etil hGH;



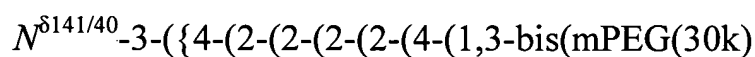
aminobutil)oximino)etil hGH;



iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 141/40}-2-(O-(4-\{5-(mPEG(30k)iloxi-5\text{-oxopentanoil}\}$

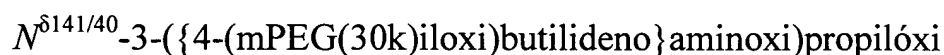
aminobutil)oximino)etil hGH;



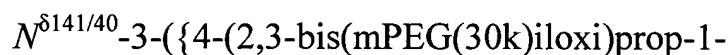
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

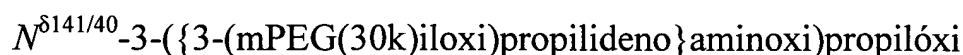
15 $N^{\delta 141/40}-3-(\{4-(1,3\text{-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-}$
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;



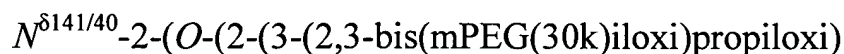
hGH;



20 iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



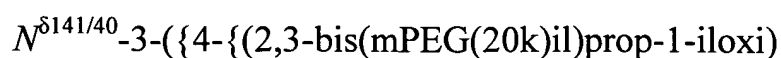
hGH;



propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 141/40}-3-(\{4-(2,3\text{-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi})$

propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



PEGuiloxi} butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)

prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}-aminobutil)

5 oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}-aminobutil)

oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-

iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}

aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno}-aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi

hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)

20 butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno}-aminoxi)propilóxi

hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)

propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)

propilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)

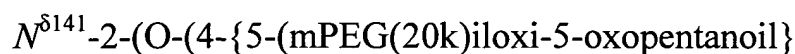
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}

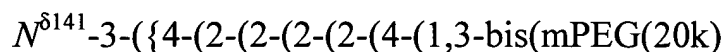
aminobutil)oximino)etil hGH;



butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;



5 aminobutil)oximino)etil hGH;

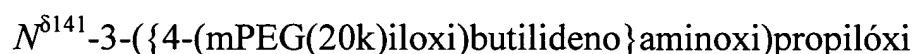


ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;



10 iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

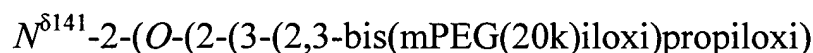


hGH;



iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

15 $N^{\delta 141}\text{-3-(\{3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi}$
hGH;



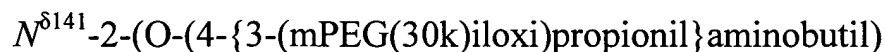
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



20 iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

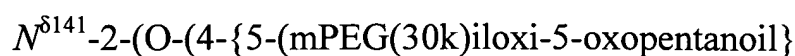


prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

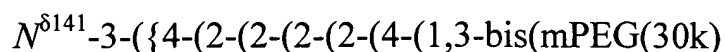


oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 141}\text{-2-(O-(4-\{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-$
iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;



aminobutil)oximino)etil hGH;



ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

5 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-
il)PEGuiloxi}butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il
propil)PEGuiloxi)butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-
(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-
(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

5 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

10 $N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

15 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

25 butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}
aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno} aminoxil)propilóxi
hGH;

5 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno} aminoxil)propilóxi hGH;

10 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

15 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno} aminoxil)prop-1-ilóxi hGH;

20 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno} aminoxil)propilóxi
hGH;

25 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno} aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno} aminoxil)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

N^{840} -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)
propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

N^{840} -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-il)
PEGuiloxi}butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

5 N^{840} -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)
butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

N^{141} -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-
propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

10 N^{141} -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-
butil)oxiimino)-etil] hGH;

N^{141} -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)
ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno)aminoxil)propiloxi) hGH;

15 N^{141} -[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)
propiloxi)carbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

N^{141} -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-
oxoetil)oximino)etil] hGH;

N^{141} -[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-
propiloxi)butilideno)aminoxil)propiloxiimino)etil] hGH;

20 $N^{141/40}$ -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-
2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

$N^{141/40}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-
butil)oxiimino)-etil] hGH;

25 $N^{141/40}$ -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)
ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno)aminoxil)propiloxi) hGH;

$N^{141/40}$ -[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)
propiloxi)carbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

$N^{141/40}$ -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-

oxoetil)oximino)etil] hGH;

N^{ϵ} 141/40-[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butilideno)aminoxi)propiloxiimino)etil] hGH;

5 N^{ϵ} 40-[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

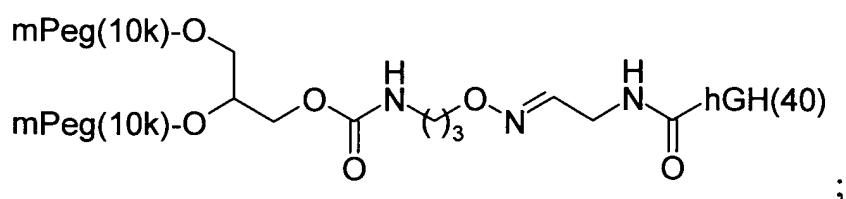
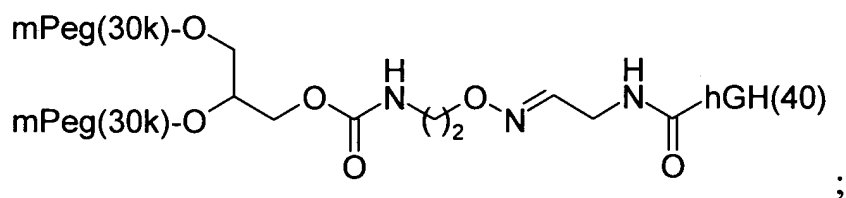
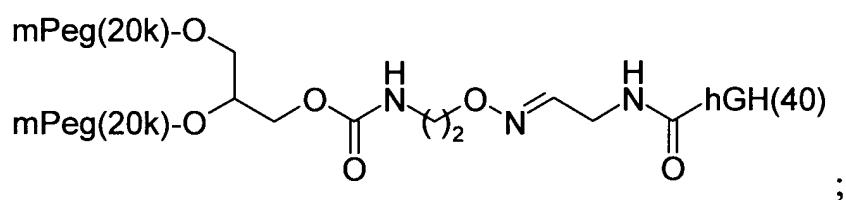
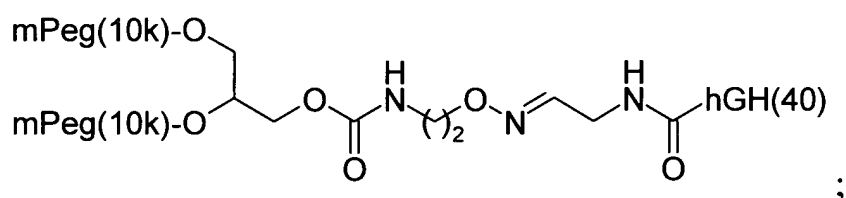
N^{ϵ} 40-[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-butil)oxiimino)-etil] hGH;

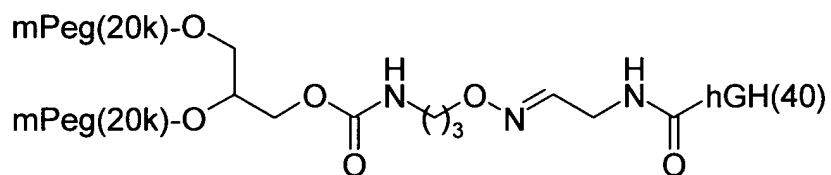
N^{ϵ} 40-(3-(((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)
 ilaminocarboniloxy)-2-propiloxy)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
 10 butilideno)aminoxi)propiloxy) hGH;

N^{ϵ} 40-[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)propiloxycarbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

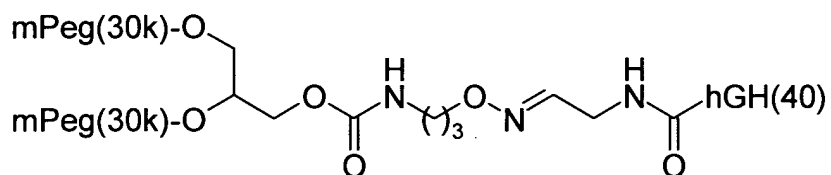
N^{ϵ} 40-[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)oximino)etil] hGH;

15 N^{ϵ} 40-[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-
propiloxi)butilideno)aminox)propiloxiimino)etil] hGH;

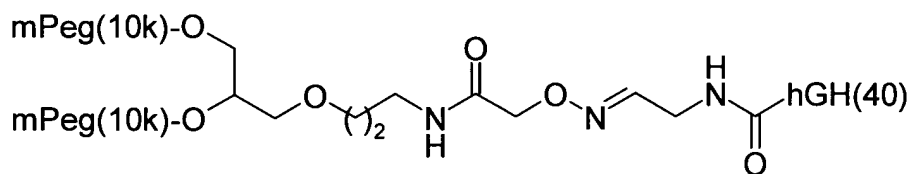




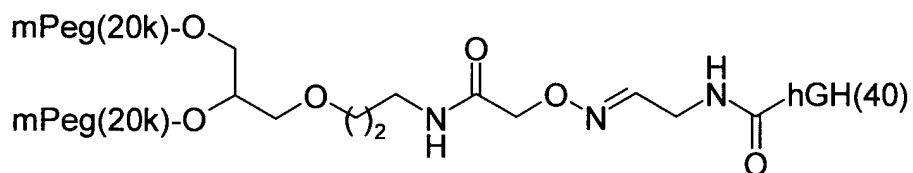
;



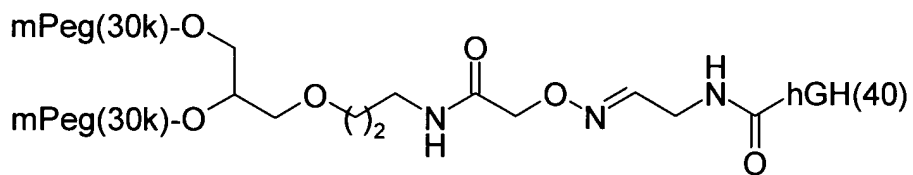
;



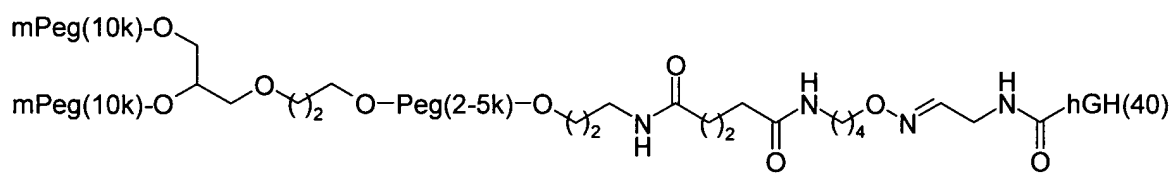
;



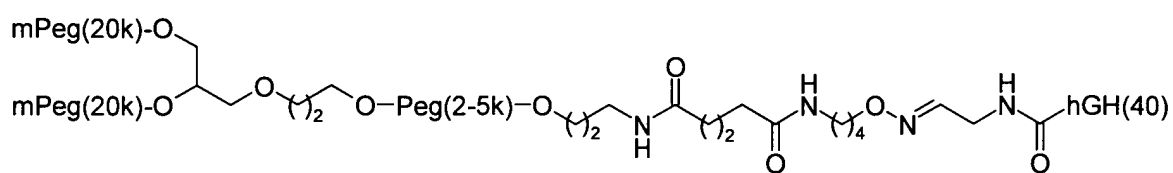
,



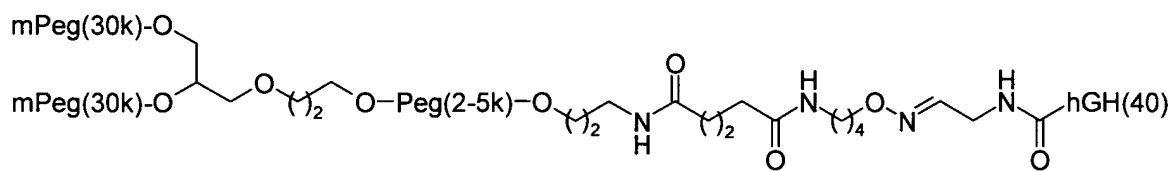
;



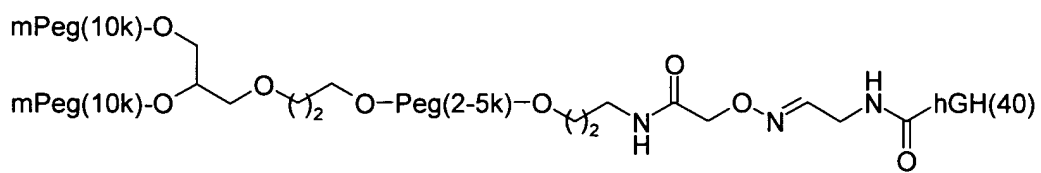
;



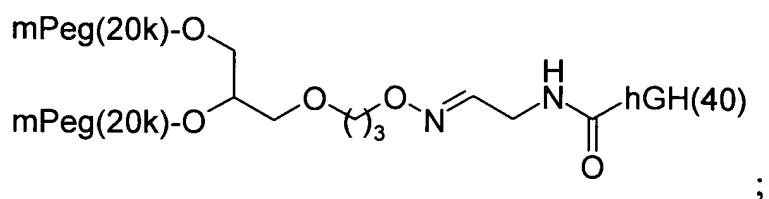
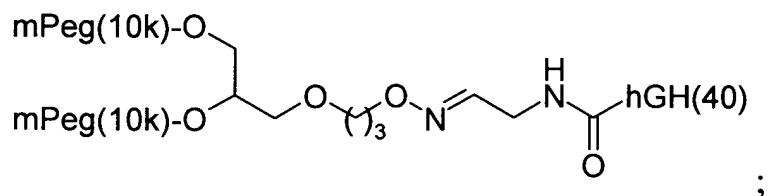
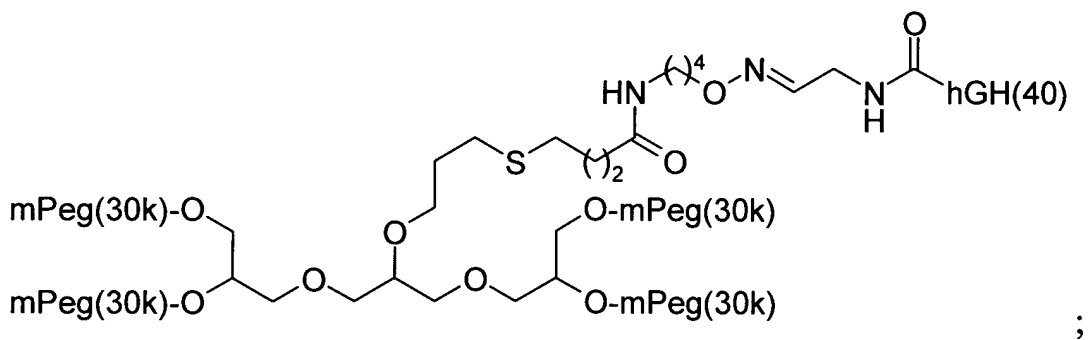
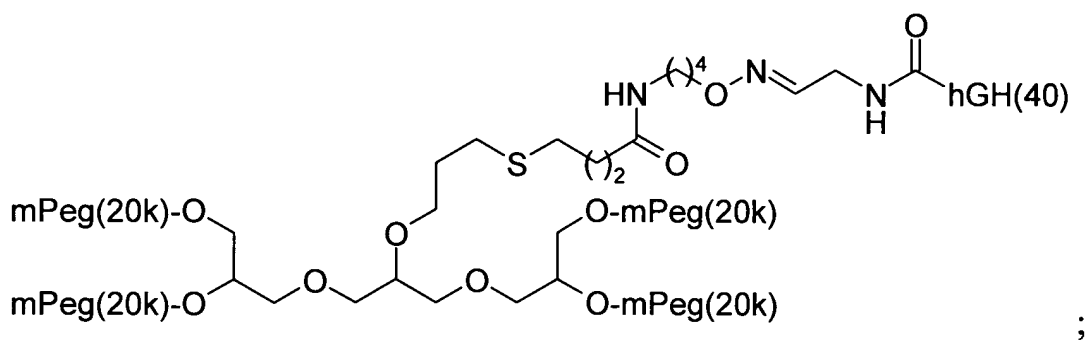
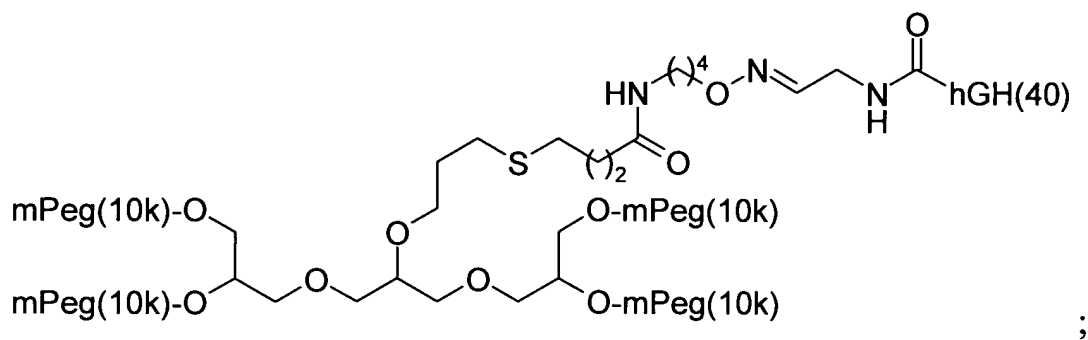
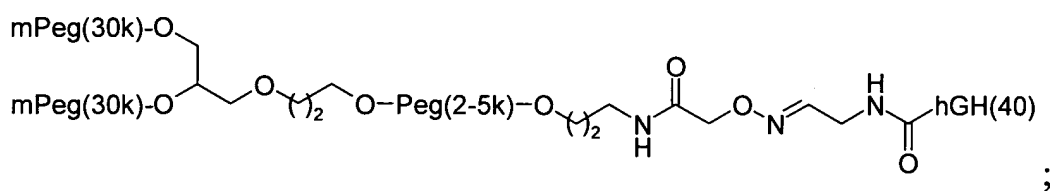
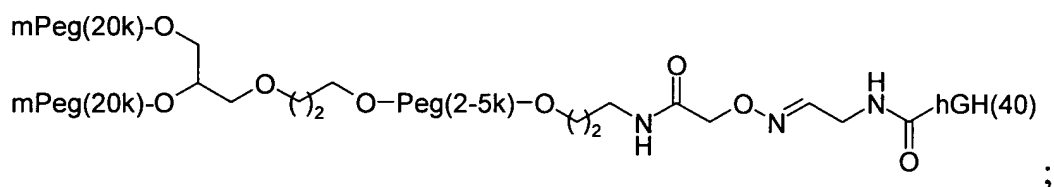
;

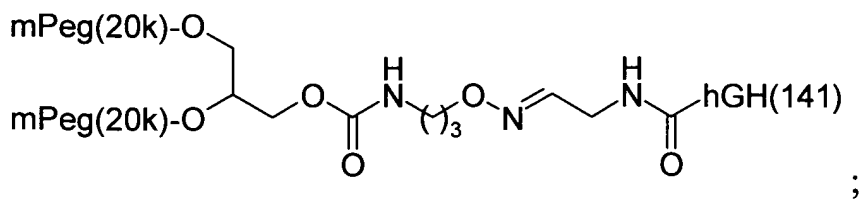
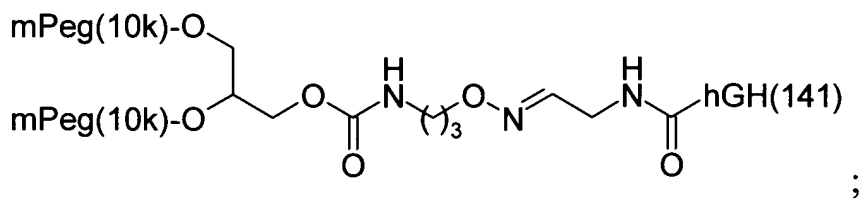
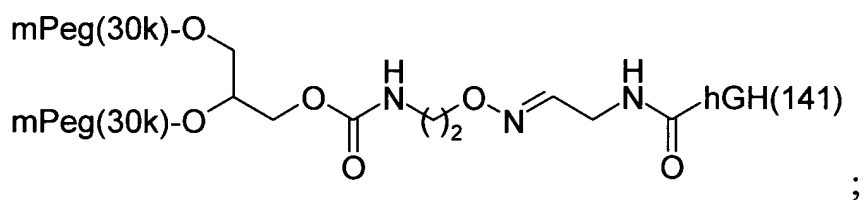
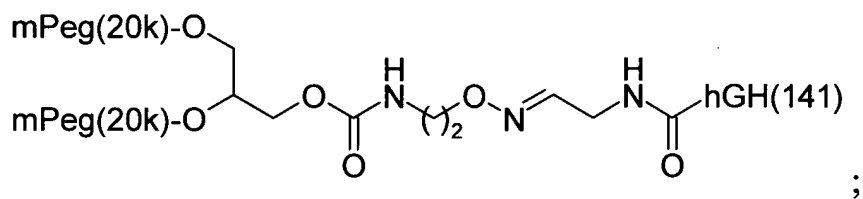
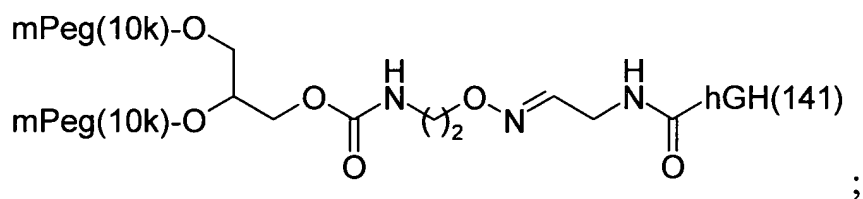
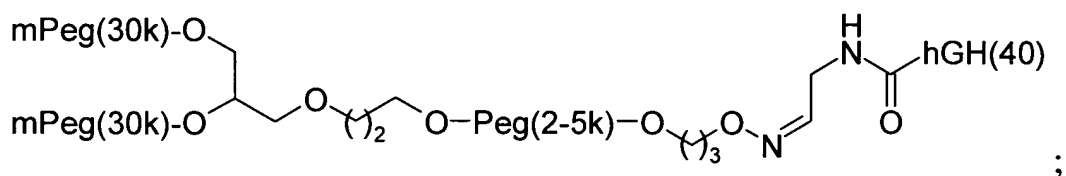
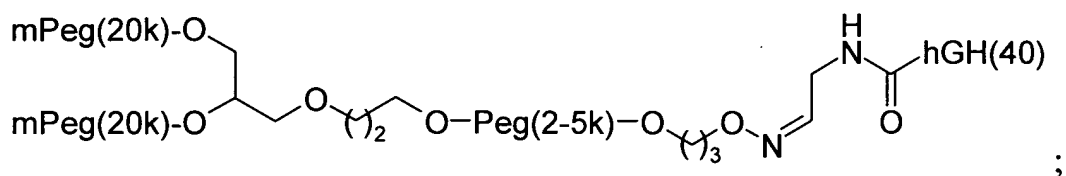
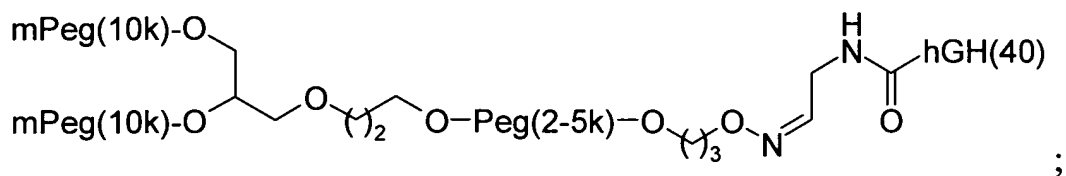
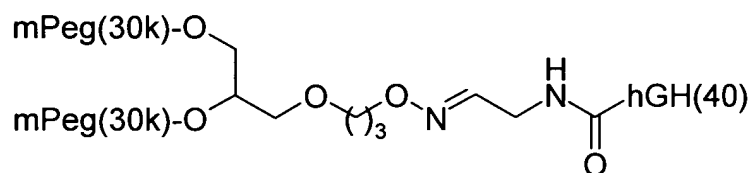


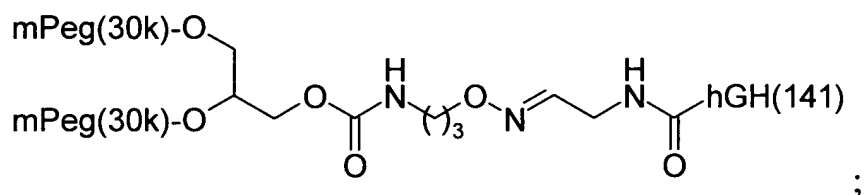
;



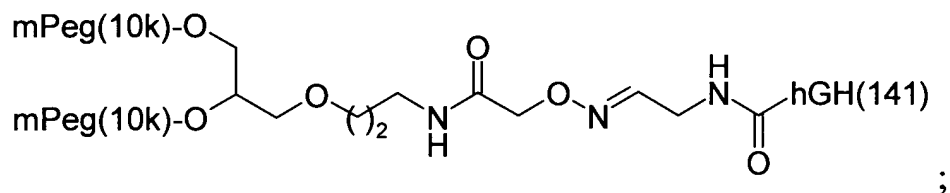
;



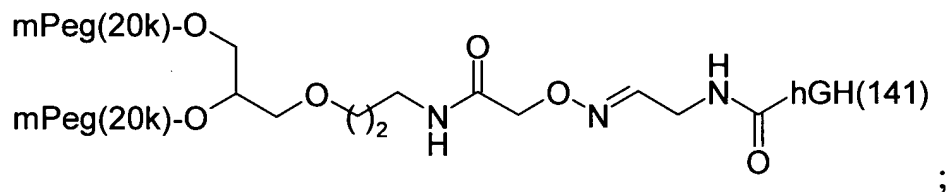




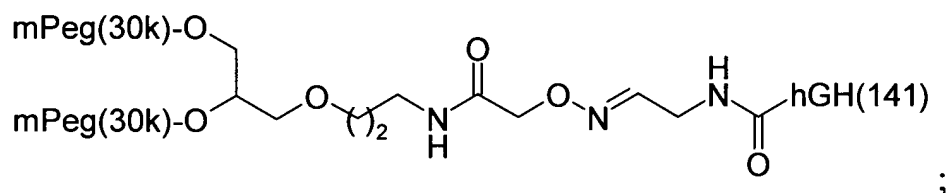
;



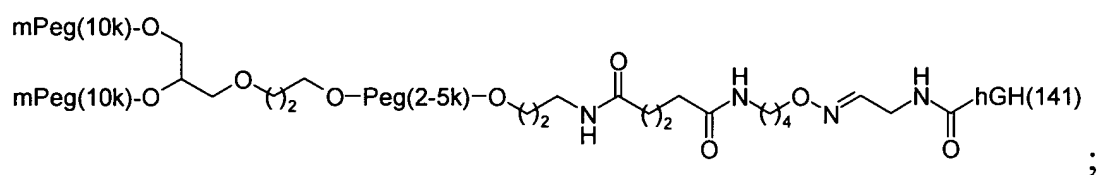
;



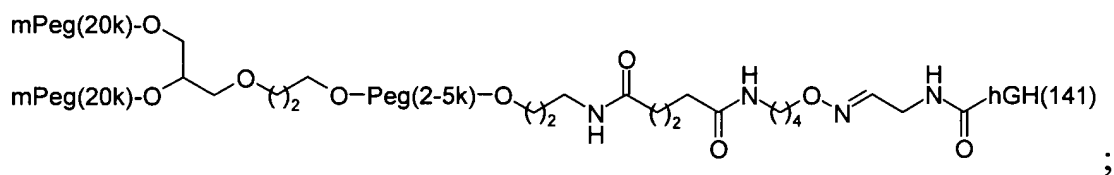
;



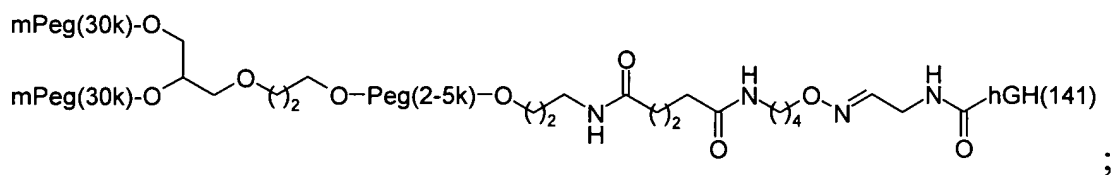
;



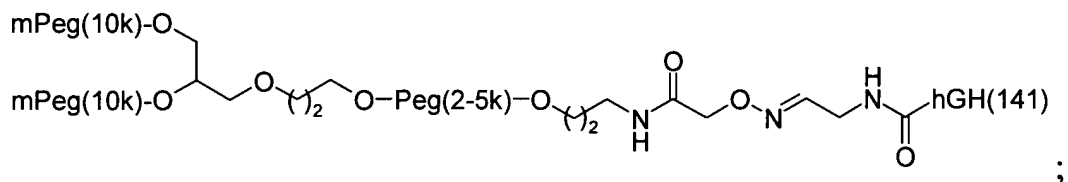
;



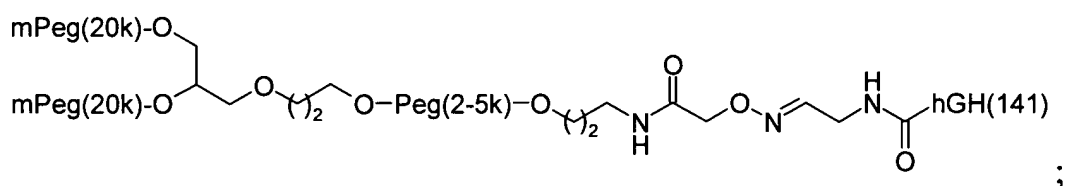
;



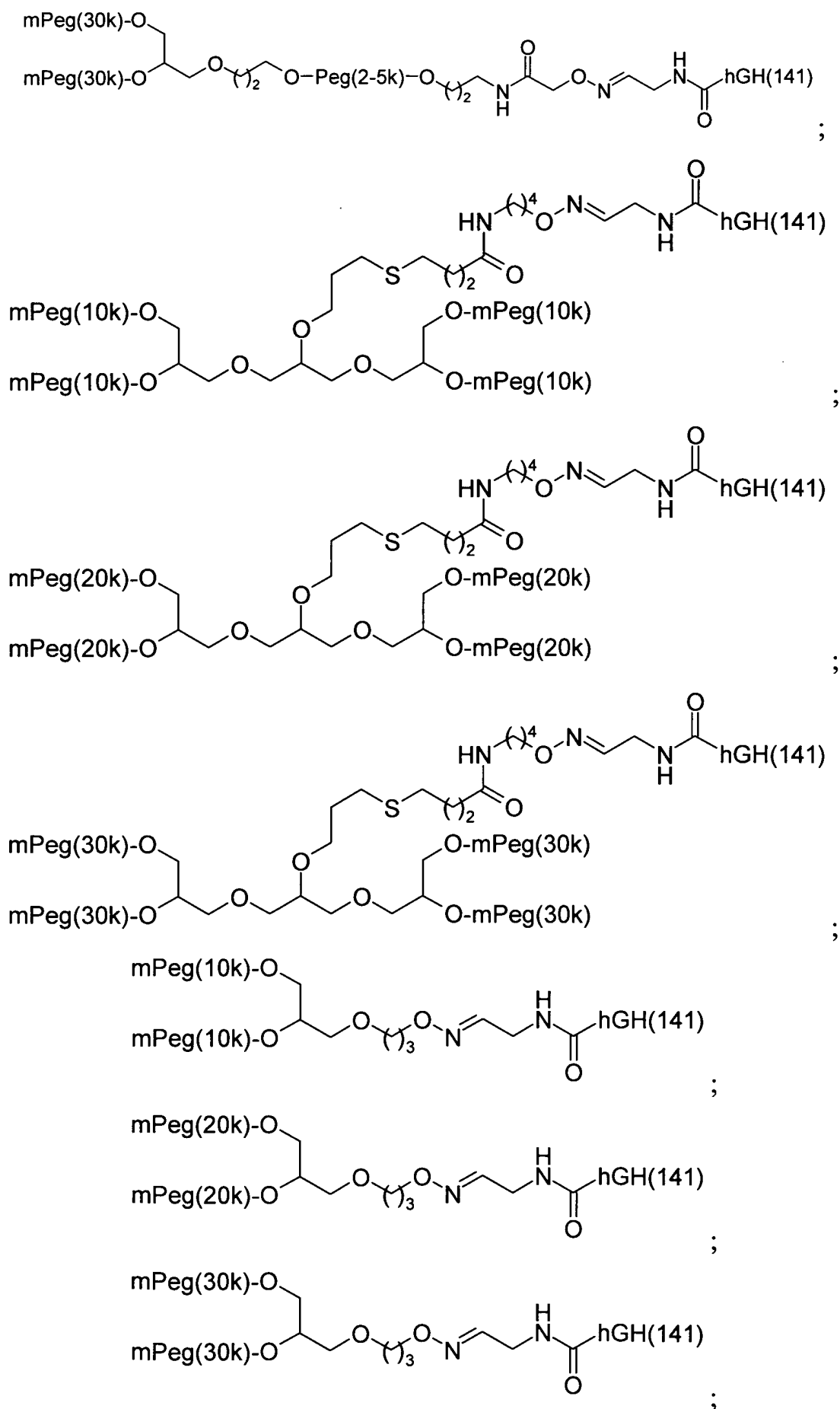
;

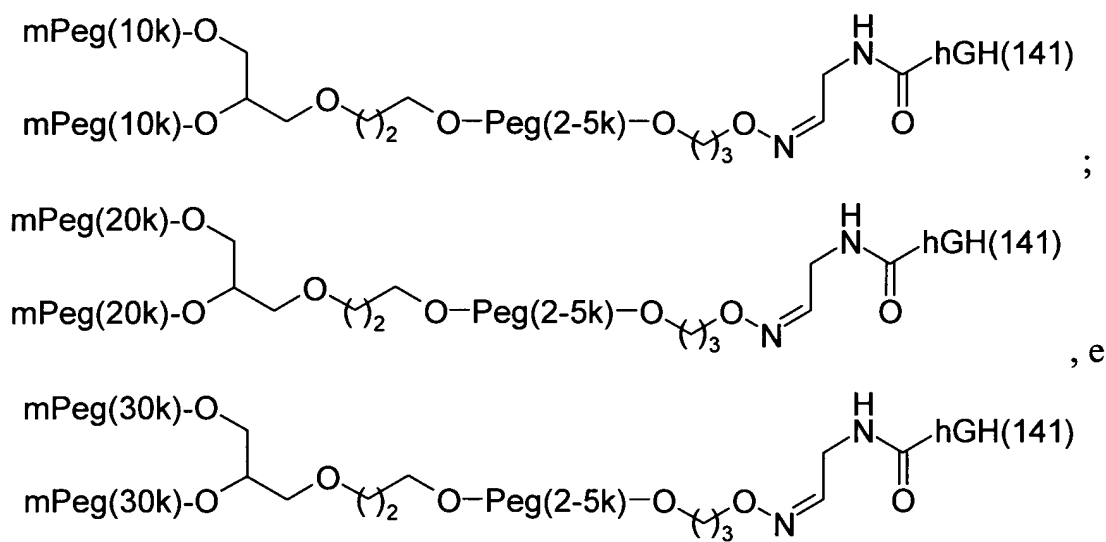


;

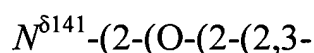


;



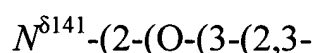


Algumas das representações gráficas acima também podem ser
alternativamente representadas como

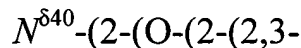


Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxicarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH,

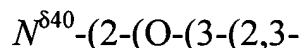
5



Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxicarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH,

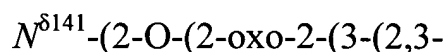


Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxicarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH,

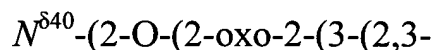


10

Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxicarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH,

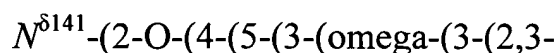


Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH,

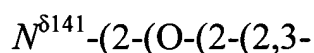


Bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH,

15

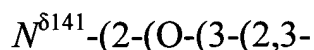


bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propiloxi)polioxietileniloxi)propilamino)-1,5-
dioxopentilamino)butil)oximinoetil) hGH,



Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxicarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH

20



Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxicarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH

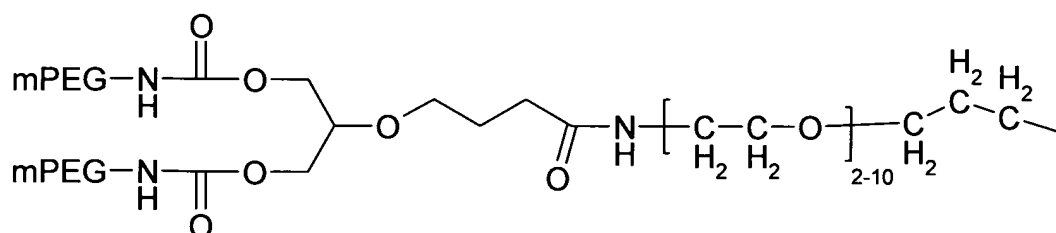
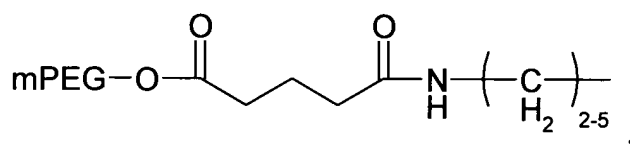
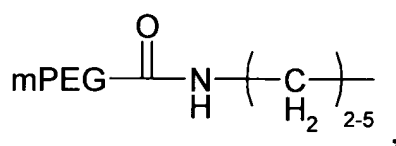
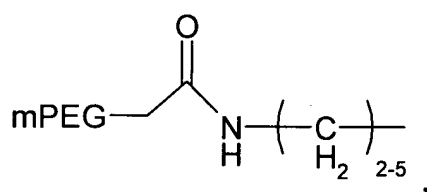
- $N^{\delta 40}$ -(2-(O-(2-(2,3-
 Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxycarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH
 $N^{\delta 40}$ -(2-(O-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxycarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH
 5 $N^{\delta 141}$ -(2-O-(2-oxo-2-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH
 $N^{\delta 40}$ -(2-O-(2-oxo-2-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH,
 $N^{\delta 141}$ -(2-O-(4-(5-(3-(omega-(3-(2,3-
 10 bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)propiloxi)polioxietileniloxi)propilamino)-1,5-
 dioxopentilamino)butil)oximinoetil) hGH,
 $N^{\delta 141}$ -(2-(O-(2-(2,3-
 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxycarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH,
 $N^{\delta 141}$ -(2-(O-(3-(2,3-
 15 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxycarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH,
 $N^{\delta 40}$ -(2-(O-(2-(2,3-
 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxycarbonilamino)etil)oximino)etil) hGH,
 $N^{\delta 40}$ -(2-(O-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxycarbonilamino)propil)oximino)etil) hGH,
 20 $N^{\delta 141}$ -(2-O-(2-oxo-2-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH,
 $N^{\delta 40}$ -(2-O-(2-oxo-2-(3-(2,3-
 Bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)propilamino)etil)oximinoetil) hGH, and
 $N^{\delta 141}$ -(2-O-(4-(5-(3-(omega-(3-(2,3-
 25 bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)propiloxi)polioxietileniloxi)propilamino)-1,5-
 dioxopentilamino)butil)oximinoetil) hGH.

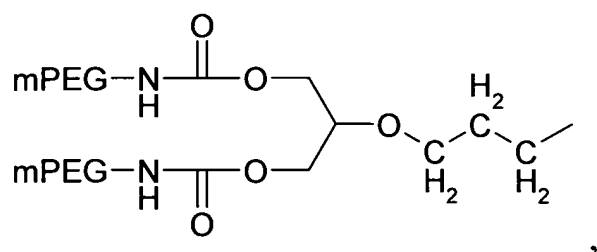
Em uma forma de realização, a presente invenção refere-se a composto de acordo com a fórmula [VI]

em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em referido polipeptídeo;

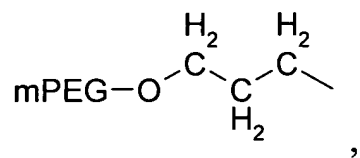
5

A representa uma ligação oxima;

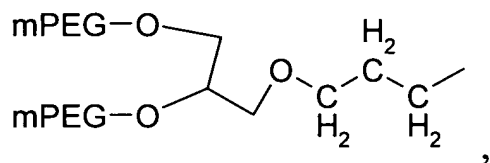
O=C(OCC(OC(=O)Nc1ccc(NC(=O)OCC(OC(=O)Nc2ccc(NC(=O)OCC(OC(=O)Nc3ccc(NC(=O)OCC(OC(=O)Nc4ccccc4)cc3)cc2)cc1)cc0)c(CCCC(=O)NC5CCCCC5)CO



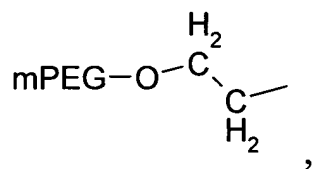
,



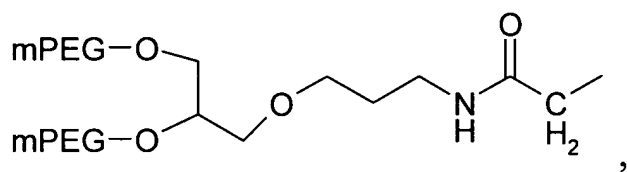
,



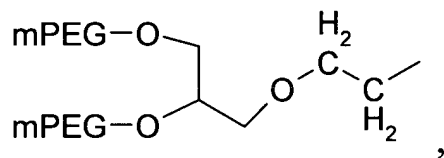
,



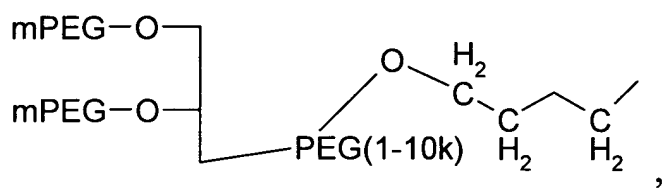
,



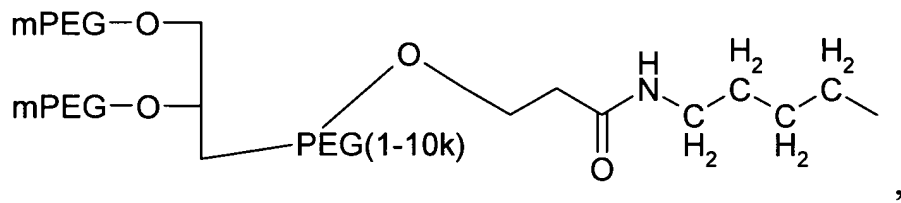
,



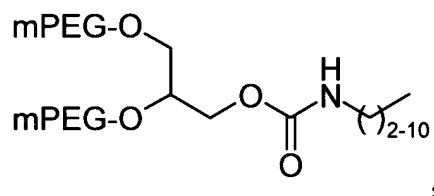
,



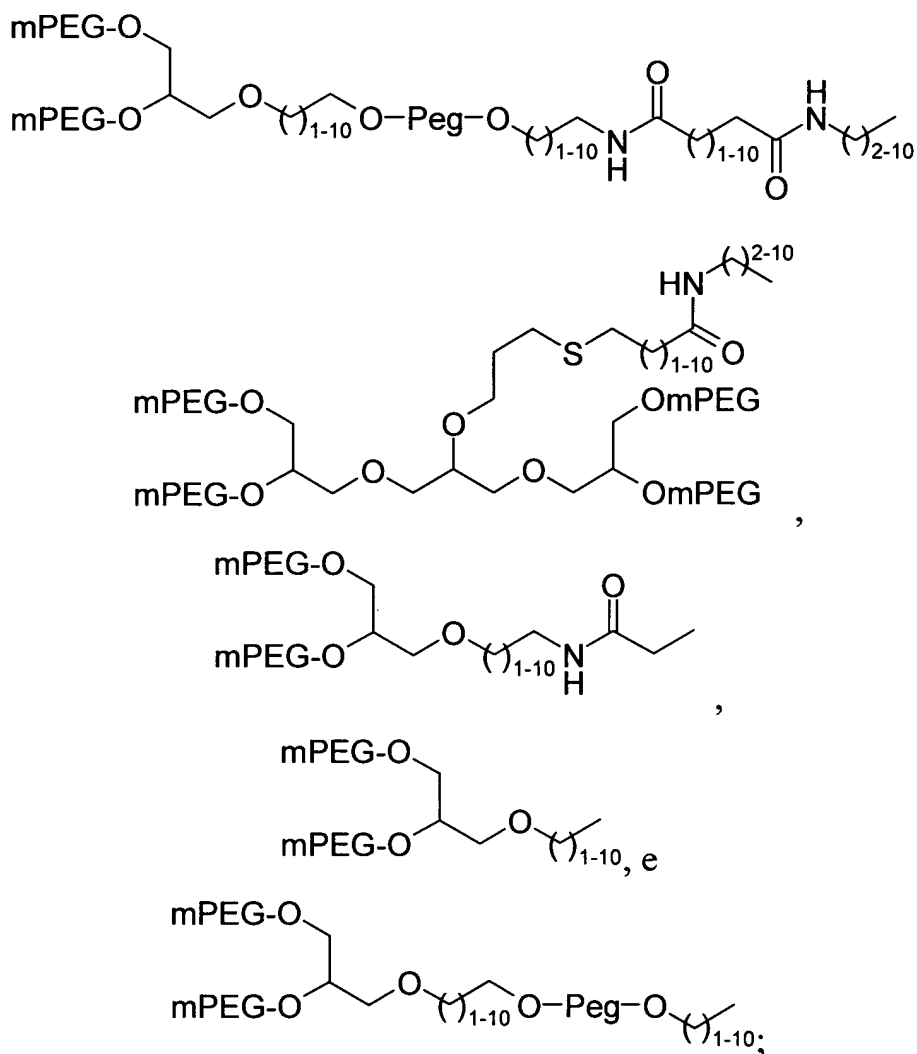
,



,



,



em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis do

5 mesmo

Em uma forma de realização, o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes no hormônio de crescimento.

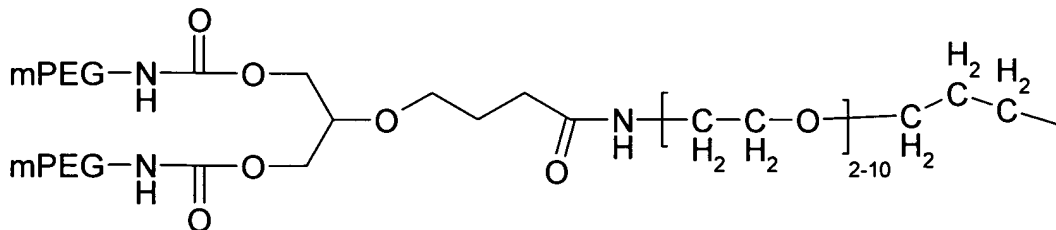
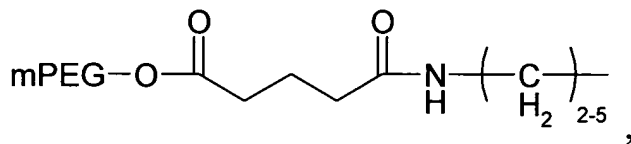
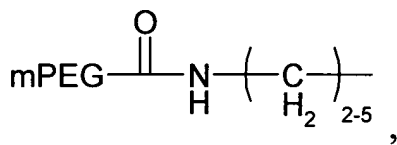
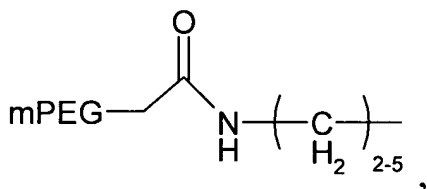
10

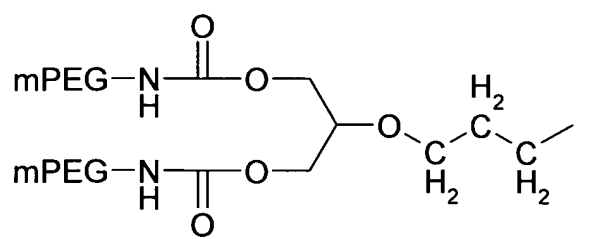
Em uma forma de realização, a presente invenção provê um composto de acordo com a fórmula [VIa]

em que GH representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em referido hormônio de crescimento;

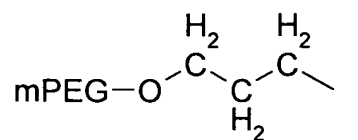
5

A representa uma ligação oxima;

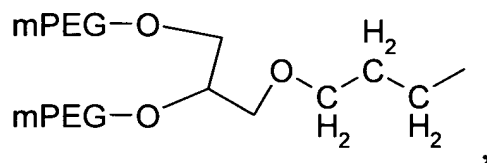
O=C(OCC(OC(=O)NCCO)OCC(=O)NCCO)OCC(=O)NCCO



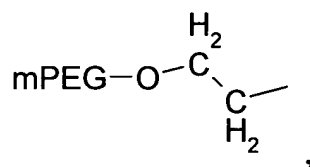
,



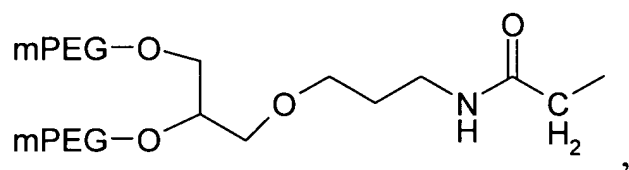
,



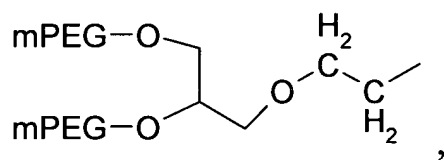
,



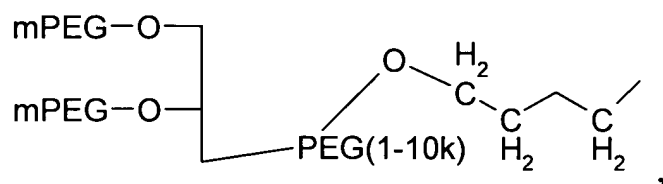
,



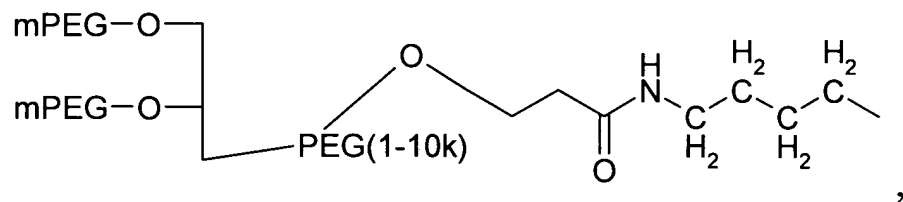
,



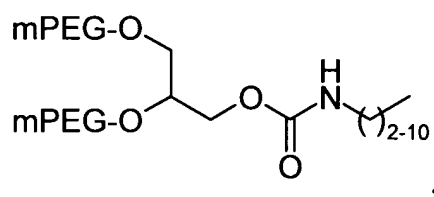
,



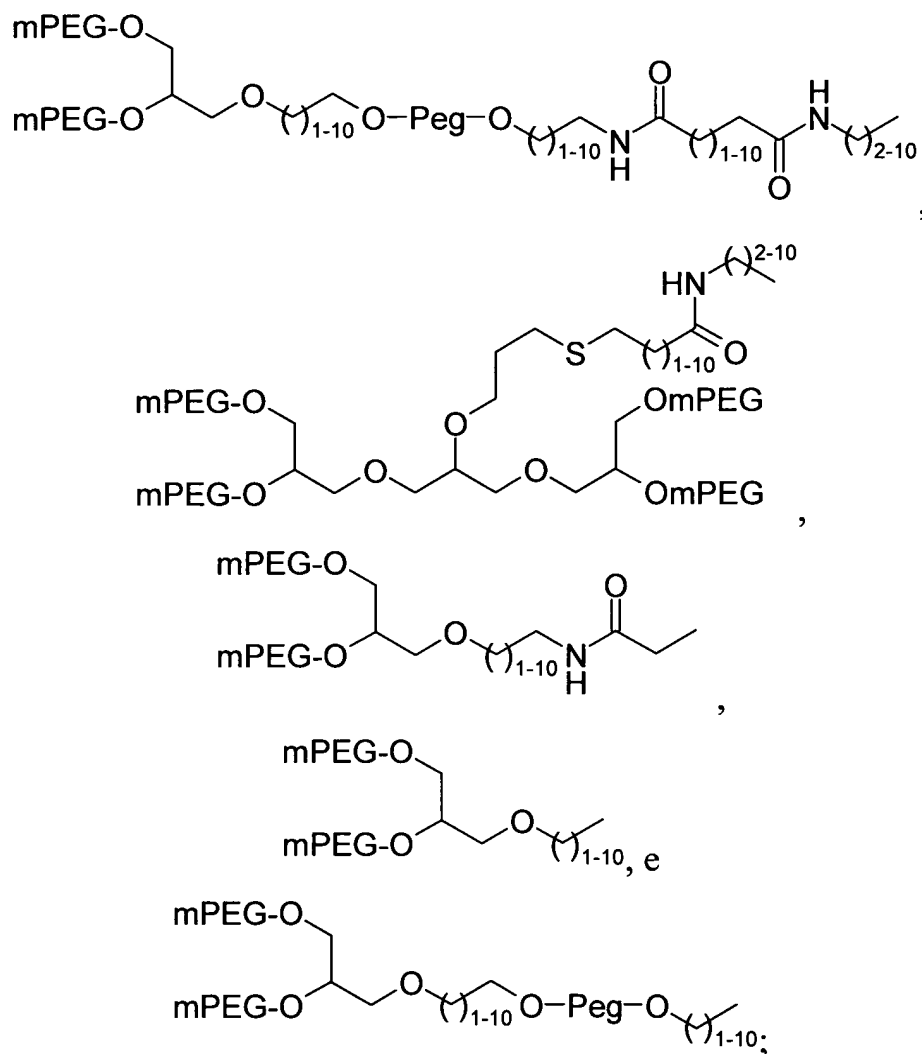
,



,



,



em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis do

5 mesmo.

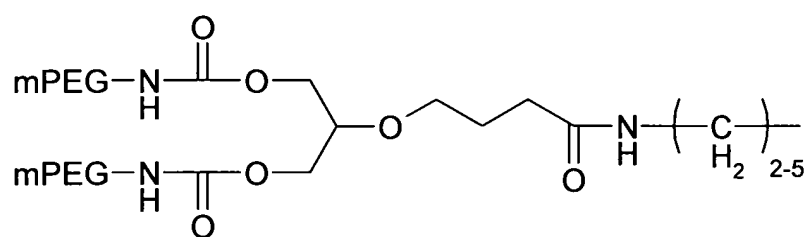
Em uma forma de realização, D representa -O-.

Em uma forma de realização, D representa uma ligação única.

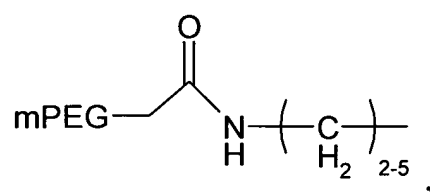
Em uma forma de realização, R representa $-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-CH_2-$ ou $-(CH_2)_4-CH(NHCOCH_3)-CO-NH-CH_2-$.

10 Em uma forma de realização, R representa C_{1-6} alquilenos. Em uma outra forma de realização, R representa C_{1-3} alquilenos. Em uma outra forma de realização, R representa metileno, etileno ou propileno. Em uma outra forma de realização, R representa metileno ou propileno.

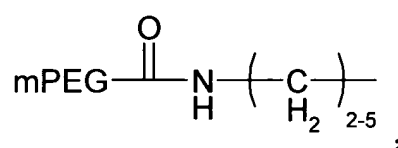
Em uma forma de realização, Z representa



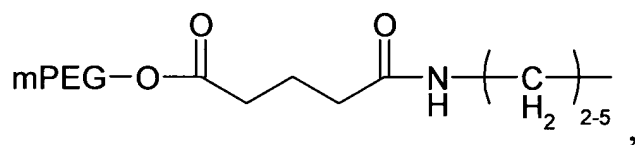
,



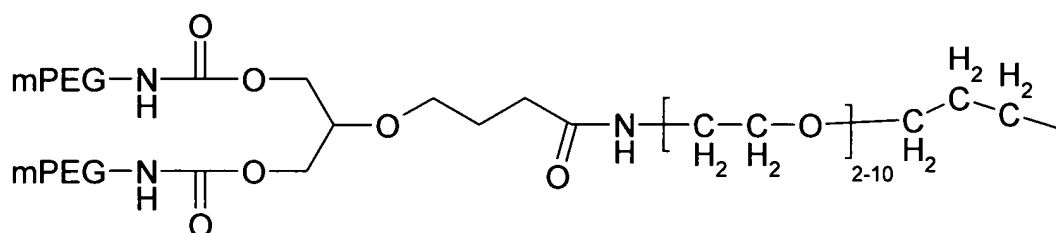
,



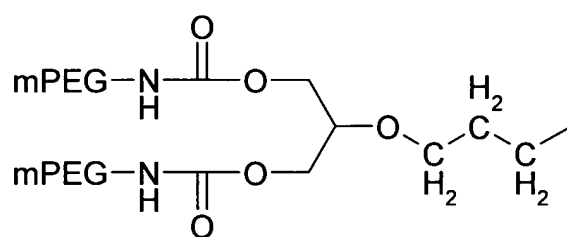
,



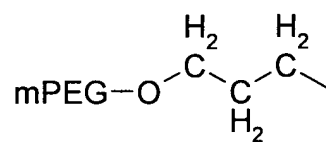
,



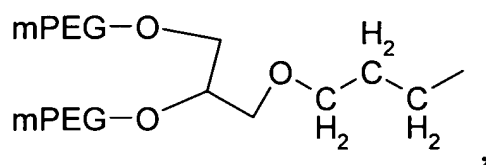
,



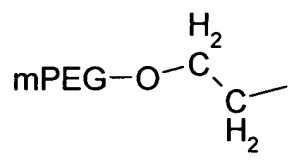
,



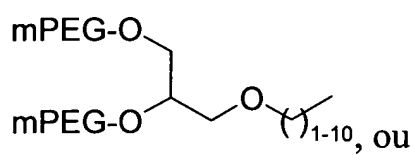
,

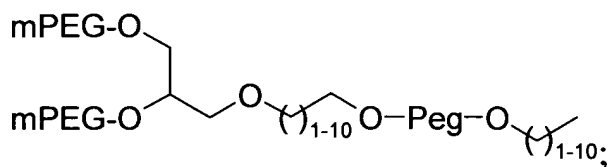


,



,





em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa.

Em uma forma de realização, GH na fórmula [VIa] representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em um hGH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

Em uma forma de realização, GH em fórmula [VIa] representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em 20 kDa hGH.

Em uma forma de realização, GH em fórmula [VIa] representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e da cadeia lateral do resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1;

ou

representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um outro resíduo de glutamina presente na posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

ou

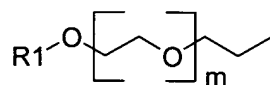
representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição

correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um outro resíduo de glutamina presente em uma posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

5 ou

representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de duas glutaminas presentes em um hGH em posições diferentes das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1, em que quaisquer resíduos de glutamina presentes nas posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outros aminoácidos.

Em uma forma de realização adicional ou alternativa, a invenção provê métodos e compostos descritos aqui, em que cada caso de “mPEG” é substituído por um alcóxi-PEG ou composto “aPEG” da fórmula



15 em que m é um inteiro maior do que 1. Cada R1 pode ser qualquer grupo alquila C_{1-10} apropriado, ramificado ou (for C_{3-10}) não ramificado, incluindo, mas limitados a, metila, etila, propila, e butila.

A presente invenção também provê um composto obtido por uso de um método de acordo com a invenção.

20 A presente invenção também provê um composto caracterizado pelo fato de ser obténível pelo uso de um método de acordo com a invenção.

Compostos da presente invenção exercem atividade de hormônio de crescimento e pode como tal ser usado no tratamento de doenças ou estados que irão se beneficiar de um aumento na quantidade de hormônio de crescimento circulante. Em particular, a invenção provê um método para o tratamento de deficiência de hormônio de crescimento (GHD); Síndrome de Turner; Síndrome de Prader-Willi (PWS); Síndrome de Noonan; Síndrome de

Down; doença renal crônica, artrite reumatóide juvenil; fibrose cística, infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas que cresceram baixas na idade gestacional (SGA); estatura baixa em crianças que nasceram com peso muito baixo (VLBW) mas SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tal como tíbia, fíbula, fêmur, úmero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso, e dígito; fraturas em ou de ossos espongiaes, tal como o remo, base de mão, e base do pé; pacientes após cirurgia dos tendões ou ligamentos em por exemplo mão, joelho, ou ombro; pacientes tendo ou passando através de osteogênese de distração; pacientes após substituição de bacia ou disco, reparo do menisco, fusões da espinha ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, ombro, pulso ou maxilar; pacientes em que o material de osteossíntese, tal como pregos, parafusos e placas, foram fixados; pacientes com falta de união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo da tíbia ou do primeiro dedo; pacientes após implante de enxertos; degeneração de cartilagem articular em joelho causado por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular associada com má nutrição APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idosos com APCD; doença crônica do fígado APCD, síndrome de fadiga em APCD; doença de Crohn; função de fígado prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome de intestino curto; obesidade central; síndrome de lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva principal, destoxificação de álcool/drogas ou trauma neurológico; envelhecimento; idosos frágeis; osteo-artrite; cartilagem traumáticamente danificada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; dano traumático ao

cérebro; dano traumático da medula espinhal; 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 em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com a presente invenção. Em particular, referido composto é um composto de fórmula [Va] ou fórmula [VIa].

O termos “tratamento” e “tratando” como usado aqui significa o controle e cuidado de um paciente com o fim de combater uma condição, tal como uma doença ou a distúrbio. O termo se destina a incluir o espectro completo de tratamentos para uma dada condição da qual o paciente está sofrendo, tal como administração do composto ativo para aliviar os sintomas ou complicações, para retardar a progressão da doença, distúrbio ou condição, para diminuir ou aliviar os sintomas ou complicações, e/ou para curar ou eliminar a doença, distúrbio ou condição assim como para evitar a condição, em que prevenção deve ser entendida como o controle e o cuidado de um paciente para o fim de combater a doença, condição, ou distúrbio e inclui a administração dos compostos ativos para evitar o início dos sintomas ou complicações. O paciente a ser tratado é preferivelmente um mamífero, particularmente um ser humano, mas também pode incluir animais como cachorros, gatos, vacas, ovelhas e suínos. Mesmo assim, deve-se reconhecer que regimes terapêuticos e regimes profiláticos (preventivos) representam aspectos separados da invenção.

A "quantidade terapeuticamente eficaz" de um composto como usado aqui significa uma quantidade suficiente para curar, aliviar ou parcialmente parar as manifestações clínicas de uma dada doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para obter isto é definida como "quantidade terapeuticamente eficaz". As quantidades eficazes para cada fim irão depender de, por exemplo, a severidade da doença ou dano assim como o

peso, sexo, idade e estado geral do indivíduo. Será entendido que a determinação de uma dosagem apropriada pode ser obtida usando experimentação de rotina, por construção de uma matriz de valores e teste de diferentes pontos na matriz, que está bem de acordo com os conhecidos de um médico ou veterinário especializado.

A presente invenção assim provê um composto de acordo com a invenção para uso em terapia.

Em um aspecto, a invenção provê um método para a aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; aceleração ou melhora do fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido danificado, o método compreendendo a administração a um paciente em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da presente invenção. Em particular, referido composto é um composto de fórmula [Va] ou fórmula [VIa].

Em uma forma de realização, a invenção refere-se ao uso de compostos de acordo com a presente invenção na fabricação de doenças se beneficiando de um aumento no nível no plasma de hormônio de crescimento, tal como a doença mencionada acima. Em particular, referido composto é um composto de fórmula [Va] ou fórmula [VIa].

Uma dose parenteral típica está na faixa de 10^{-9} mg/kg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal por administração. As doses de administração típicas são de cerca de 0,0000001 a cerca de 10 mg/kg de peso corporal por administração. A dose exata irá depender de, por exemplo indicação, medicamento, frequência e modo de administração, o 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 para os versados na técnica.

As frequências de dosagem típicas são de duas vezes

diariamente, uma vez diariamente, duas vezes semanalmente, um vez semanalmente ou com intervalos de dosagem ainda maiores. Devido às meias-vidas prolongadas dos compostos da presente invenção comparadas com um hormônio de crescimento não conjugado correspondente, um regime de dosagem com intervalos de longa duração, como duas vezes semanalmente ou uma vez por semana, ou com mesmo intervalos de dosagem mais longos, é uma forma de realização particular da invenção.

Muitas doenças são tratadas usando mais do que um medicamento no tratamento, ou concomitantemente administrado ou sequencialmente administrado. Assim, está dentro do escopo da presente invenção usar compostos da presente invenção em métodos terapêuticos para o tratamento de uma das acima mencionadas doenças em combinação com um ou mais de outros compostos terapeuticamente ativos normalmente usados no tratamento das referidas doenças. Por analogia, também está dentro do escopo da presente invenção usar compostos da presente invenção em combinação com outros compostos terapeuticamente ativos normalmente usados no tratamento de uma das acima mencionadas doenças na fabricação de um medicamento para a referida doença.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Outro fim consiste em prover composições farmacêuticas compreendendo um composto da presente invenção que está presente em uma concentração de 10^{-15} mg/ml a 200 mg/ml, tal como por exemplo 10^{-10} mg/ml a 5 mg/ml e em que referido composição tem um pH de 2,0 a 10,0. A composição pode ainda compreender um sistema tampão, conservante(s), agente(s) de tonicidade, agente(s) quelante(s), estabilizadores e tensoativos. Em uma forma de realização da invenção, a composição farmacêutica é uma composição aquosa, isto é composição compreendendo água. Esta composição é tipicamente uma solução ou uma suspensão. Em ainda uma outra forma de realização 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. Do mesmo modo, o termo “solução aquosa” é definido como uma solução compreendendo pelo menos 50 %p/p água, e o termo “suspensão aquosa” é definido como uma
 5 suspensão compreendendo pelo menos 50 % p/p água.

Em outra forma de realização, a composição farmacêutica é uma composição seca pro pulverização, à qual o médico ou paciente adiciona solventes e/ou diluentes antes do uso.

Em outra forma de realização, a composição farmacêutica é
 10 uma composição seca (por exemplo seca por congelamento ou seca por pulverização) pronta para uso sem qualquer dissolução anterior.

Em um outro aspecto a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo uma solução aquosa de um composto da presente invenção, e um tampão, em que referido composto está presente em
 15 uma concentração de 0,1 -100 mg/ml ou acima, e em que referida composição tem um pH de cerca de 2,0 a cerca de 10,0.

Em outra forma de realização da invenção, o pH da composição é selecionada dentre a lista consistindo de 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,
 20 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 10,0.

Em uma outra forma de realização da invenção, o tampão é
 25 selecionado dentre o grupo consistindo de acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato de sódio, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, di-hidrogeno fosfato de sódio, hidrogeno fosfato de dissódio, fosfato de sódio e tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido malico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou suas misturas.

Cada um destes tampões específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um conservante farmacêuticamente aceitável. Em uma
5 outra forma de realização da invenção, o conservante é selecionado dentre o grupo consistindo de fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butila, 2-feniletanol, álcool benzílico, clorobutanol, e tiomerosal, bronopol, ácido benzóico, imiduréia, clorohexidina, dehidroacetato de sódio,
10 clorocresol, p-hidroxibenzoato de etila, cloreto de benzetônio, clorfenesina (3p-chlorfenoxipropano-1,2-diol) ou suas misturas. Em uma outra forma de realização da invenção, o conservante está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o conservante está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. Em
15 uma outra forma de realização da invenção, o conservante está presente em uma concentração de 5 mg/ml a 10 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o conservante está presente em uma concentração de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada um destes conservantes específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um conservante em composições
20 farmacêuticas é bem conhecido do versado. Por conveniência referência é feita a Remington: *Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edição, 2000.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um agente isotônico. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente isotônico é selecionado dentre o grupo consistindo de um
25 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 PEG400), ou suas misturas.

Qualquer açúcar, como mono-, di-, ou polissacarídeos, ou glucanos solúveis em água, incluindo por exemplo fructose, glucose, mannose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sacarose, trehalose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, amido hidroxietila e carboximetilcelulose-Na

5 pode ser usado. Em uma forma de realização, aditivo de açúcar e sacarose. O álcool de açúcar é definido como um hidrocarboneto C4-C8, tendo pelo menos um grupo -OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, e arabitol. Em uma forma de realização, o aditivo de álcool de açúcar é manitol. Os açúcares ou álcoois de açúcar, mencionados

10 acima, podem ser usados individualmente ou em combinação. Não se tem um limite fixo para a quantidade usada, desde que o açúcar ou álcool de açúcar seja solúvel na preparação líquida e não afete adversamente os efeitos estabilizantes obtidos usando os métodos da invenção. Em uma forma de realização, a concentração do açúcar ou álcool de açúcar está entre cerca de 1

15 mg/ml e cerca de 150 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de 1 mg/ml a 50 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de 1 mg/ml a 7 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente isotônico está presente em uma

20 concentração de 8 mg/ml a 24 mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada um destes agentes isotônicos específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um agente isotônico em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado. Por conveniência

25 referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edição, 2000.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um agente quelante. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente quelante é selecionado dentre sais de ácido etilenodiamina

tetraacético (EDTA), ácido cítrico, e ácido aspártico, e suas misturas. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente quelante está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 5mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente quelante está presente em uma concentração de 0,1 mg/ml a 2mg/ml. Em uma outra forma de realização da invenção, o agente quelante está presente em uma concentração de 2mg/ml a 5mg/ml. Cada um destes agentes quelantes específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção. O uso de um agente quelante em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado. Por conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edição, 2000.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um estabilizador. O uso de um estabilizador em composições farmacêuticas é bem conhecido do versado. Por conveniência referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edição, 2000.

Mais particularmente, composições da invenção são composições farmacêuticas líquidas estabilizadas, cujos componente terapeuticamente ativos incluem uma proteína que possivelmente demonstra formação de agregado durante armazenamento em composições farmacêuticas líquidas. Por "formação de agregado" pretende-se uma interação física entre as moléculas da proteína que resulta na formação de oligômeros, que podem permanecer solúveis ou agregados visíveis grandes que precipitam da solução. Por "durante armazenamento" pretende-se composições farmacêuticas ou líquidas ou composição que uma vez preparada, não é imediatamente administrada a um indivíduo. Ao contrário, após a preparação, ela é embalada para armazenamento, ou em uma forma líquida ou em um estado congelado, ou em uma forma seca para posterior reconstituição em uma forma líquida ou outra forma apropriada para administração a um indivíduo. Por "forma seca", pretende-se uma composição

farmacêutica líquida ou composição que é seca por ou secagem por congelamento(isto é, liofilização, ver, por exemplo, Williams e Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secagem por pulverização (ver Masters (1991) em Spray-Secagem Handbook (5a. ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; e Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20), ou secagem ao ar (Carpenter e Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; e Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). A formação de agregados por uma proteína durante o armazenamento de uma composição farmacêutica líquida pode afetar adversamente a atividade biológica desta proteína, resultando em perda de eficácia terapêutica da composição farmacêutica. Além disso, a formação de agregados pode causar outros problemas como bloqueio das tubulações, membranas, ou bombas, quando a composição farmacêutica contendo proteína é administrada usando um sistema de infusão.

As composições farmacêuticas da invenção podem ainda compreender um quantidade de uma base de aminoácido suficiente para diminuir a formação de agregados pela proteína durante armazenamento da composição. Por "base de aminoácido" pretende-se um aminoácido ou uma combinação de aminoácidos, onde qualquer dado aminoácido está presente ou em sua forma de base livre ou em sua forma de sal. Onde se usa uma combinação de aminoácidos, 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 sua forma de base livre enquanto outros estão presentes em suas formas de sal. Em uma forma de realização, aminoácidos usados na preparação das composições da invenção são os transportando uma cadeia lateral carregada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico, e ácido glutâmico. Qualquer estereoisômero (isto é, isômero L ou D, ou suas misturas) de um aminoácido particular (metionina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano, treonina e suas

misturas) ou combinações destes estereoisômeros ou glicina ou uma base orgânica, tal como mas limitada a imidazol, pode estar presente nas composições farmacêuticas da invenção desde que nenhum aminoácido particular ou base orgânica esteja presente ou em sua forma de base livre ou sua forma de sal. Em uma forma de realização, o L-estereoisômero de um aminoácido é usado. Em uma forma de realização o L-estereoisômero é usado. Composições da invenção também podem ser formuladas com análogos destes aminoácidos. Por "análogo de aminoácido " pretende-se um derivado do aminoácido de ocorrência natural que ocasiona o efeito desejado de formação decrescente de agregados pela proteína durante armazenamento das composições farmacêuticas líquidas da invenção. Os análogos de arginina apropriados incluem, por exemplo, aminoguanidina, ornitina e N-monoetil L-arginina, análogos de metionina apropriados incluem etionina e butionina e análogos de cisteína apropriados incluem S-metil-L cisteína. Como os outros aminoácidos, os análogos de aminoácidos são incorporado nas composições em ou sua forma de base livre ou sua forma de sal. Em uma outra forma de realização da invenção, os aminoácidos ou análogos de aminoácido são usados em uma concentração, que é suficiente para evitar o retardar a agregação das proteínas.

Em uma outra forma de realização da invenção, metionina (ou outros aminoácidos sulfúricos ou análogos de aminoácido) pode ser adicionada para inibir a oxidação de resíduos de metionina em sulfóxido de metionina quando a proteína atuando como o agente terapêutico é uma proteína compreendendo pelo menos um resíduo de metionina susceptível à tal oxidação. Por "inibição, pretende-se um acúmulo mínimo de espécies oxidadas de metionina com o passar do tempo. A inibição da oxidação de metionina resulta e uma retenção maior da proteína em sua forma molecular apropriada. Qualquer estereoisômero de metionina (isômero L ou D) ou quaisquer combinações podem ser usados. A quantidade a ser adicionada

deve ser uma quantidade suficiente para inibir a oxidação dos tais resíduos de metionina, de modo que a quantidade de sulfóxido de metionina seja aceitável para as agências reguladoras. Tipicamente, isto significa que a composição não contém mais do que cerca de 10% a cerca de 30% sulfóxido de metionina. Geralmente, isto pode ser obtido por tal adição de metionina, de modo que a relação de metionina adicionada a resíduos metionina está na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 1000:1, tal como 10:1 a cerca de 100:1.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um estabilizador selecionado dentre o grupo de polímeros de peso molecular elevado ou composto de peso molecular baixo. Em uma outra forma de realização da invenção, o estabilizador é selecionado dentre polietileno glicol (por exemplo PEG 3350), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulose ou seus derivados (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 destes estabilizadores específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção.

As composições farmacêuticas podem também compreender agentes estabilizantes que ainda melhoram a estabilidade de uma proteína terapeuticamente ativa aqui. Os agentes estabilizantes de interesse particular para a presente invenção incluem, mas não são limitados a, metionina e EDTA, que protegem a proteína contra oxidação de metionina, e um tensoativo não iônico, que protege a proteína contra a agregação associada com congelamento / descongelamento ou cisalhamento mecânico.

Em uma outra forma de realização da invenção, a composição ainda compreende um tensoativo. Em uma outra forma de realização da invenção, o tensoativo é selecionado dentre um detergente, óleo de rícino etoxilado, glicerídeos poliglicolizados, monoglicerídeos acetilados, ésteres de ácido graxo de sorbitano, polímeros em bloco polioxipropileno-polioxietileno

(por exemplo, poloxâmeros, tal como Pluronic[®] F68, poloxâmero 188 e 407, Triton X-100), ésteres de ácido graxo de sorbitano polioxietileno, derivados de polioxietileno e polietileno tal como derivados alquilados e alcoxilados (tweens, por exemplo Tween-20, Tween-40, Tween-80 e Brij-35), seus

5 derivados monoglicerídeos ou etoxilados, seus derivados diglicerídeos ou polioxietileno, 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,

10 palmitoil lisofosfatidil-L-serina e 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina ou treonina) e alquila, derivados de alcóxila (éster de alquila), alcóxi (éter de alquila) de lisofosfatidil e fosfatidilcolinas, por exemplo derivados de lauroila e miristoila de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e modificações do grupo de cabeça polar, isto é

15 colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, e DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP positivamente carregados, lisofosfatidilserina e lisofosfatidiltreonina, e glicerofosfolipídeos (por exemplo, cefalinas), gliceroglicolipídeos (por exemplo, galactopiranosídeo), esfingoglicolipídeos (por exemplo, ceramidas, gangliosídeos),

20 dodecilsfosfocolina, lisolecitina de gema de ovo, derivados de ácido fusídico (por exemplo tauro-dihidrofusidato de sódio etc.), ácidos graxos de cadeia longa e seus sais C₆-C₁₂ (por exemplo, ácido oléico e ácido caprílico), acilcarnitinas e derivados, derivados N^α-acilados de lisina, arginina ou histidina, ou derivados acilados de cadeia lateral de lisina ou arginina,

25 derivados N^α-acilados de dipeptídeos compreendendo qualquer combinação de lisina, arginina ou histidina e um aminoácido neutro ou ácido, derivados N^α-acilados de um tripeptídeo compreendendo qualquer combinação de um aminoácido neutro e dois aminoácidos carregados, DSS (docusato de sódio, CAS número de registro [577-11-7]), docusato de cálcio, CAS número de

registro [128-49-4]), docusato de potássio, CAS número de registro [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio), caprilato de sódio, ácido cólico ou seus derivados, ácidos de bile e seus sais e conjugados de glicina ou taurina, ácido ursodeoxicólico, colato de sódio, deoxicolato de sódio, taurocolato de sódio, glicocolato de sódio, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato, (sulfonatos de alquil-arila) tensoativos aniônicos monovalentes, 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 β -D-glucopiranosídeo), poloxaminas (por exemplo, Tetronic's), que são copolímeros em bloco tetrafuncionais derivados de adição seqüencial de óxido de propileno e óxido de etileno para etilenodiamina, ou o tensoativo pode ser selecionado dentre o grupo de derivados de imidazolina, ou suas misturas. Cada um destes tensoativos específicos constitui uma forma de realização alternativa da invenção.

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

É possível que outros ingredientes possam estar presentes nas composições farmacêuticas da presente invenção. Estes ingredientes adicionais podem incluir agentes umectantes, emulsificadores, antioxidantes, agentes de volume, modificadores de tonicidade, agentes quelantes, ions de metal, veículos oleaginosos, proteínas (por exemplo, albumina de soro humano, gelatina ou proteínas) e um zwitterion (por exemplo, um aminoácido tal como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Estes ingredientes adicionais, como evidente, não devem afetar adversamente a estabilidade global das composições farmacêuticas da presente invenção.

As composições farmacêuticas contendo um composto da presente invenção podem ser administradas a um paciente em necessidade de tal tratamento em vários sítios, por exemplo, em sítios tópicos, por exemplo sítios da pele e mucosas, em sítios que ultrapassam a absorção, por exemplo administração em uma artéria, em uma veia, no coração, e em sítios que envolvem a absorção, por exemplo, administração na pele, sob a pele, em um músculo ou no abdômen.

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, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, retal, ocular, por exemplos através de conjuntiva, uretal, e parenteral aos pacientes em necessidade de tal tratamento.

Composições da presente invenção podem ser administradas em várias formas de dosagem, por exemplo, como soluções, suspensões, emulsões, microemulsões, emulsão múltipla, espumas, pomadas, pastas, gessos, ungüentos, comprimidos, comprimidos revestidos, enxágües, cápsulas, por exemplo cápsulas de gelatina dura e cápsulas de gelatina mole, supositórios, cápsulas retais, gotas, géis, pulverização, pó, aerossol, inalantes, colírios, ungüentos oftálmicos, enxágües oftálmicos, pessários vaginais, anéis vaginais, ungüentos vaginais, solução de injeção, em soluções de transformação in situ, por exemplo em geleificação in situ, precipitação in situ, em cristalização in situ, solução de infusão e implantes.

Composições da invenção podem ainda ser compostas em, ou fixadas em, por exemplo, através de interações covalentes, hidrofóbicas e eletrostáticas, um veículo de fármaco, sistema de distribuição de fármacos, e sistema de distribuição de fármacos avançado, a fim de ainda melhorar a estabilidade do conjugado de GH, aumentar a biodisponibilidade, aumentar a

solubilidade, diminuir os efeitos adversos, obter cronoterapia bem conhecida do versado na técnica, e aumentar a adesão dos pacientes ou sua combinação. Exemplos de veículos, sistemas de distribuição de fármacos e sistemas de distribuição de fármacos avançados incluem, mas não são limitados a, 5 polímeros, por exemplo celulose e derivados, polissacarídeos, por exemplo dextrano e derivados, amido e derivados, poli(álcool vinílico), copolímeros de acrilato e metacrilato, ácido polilactico e poliglicolico e seus co-polímeros em bloco, polietileno glicóis, proteínas de veículo, por exemplo albumina, géis, por exemplo, sistemas de termo-geleificação, por exemplo sistemas co- 10 poliméricos em bloco bem conhecidos do versado na técnica, micelas, lipossomas, microesferas, nanoparticulados, cristais líquidos e suas dispersões, fase L2 e dispersões da mesma bem conhecidas do versado na técnica de comportamento de fases em sistemas lipídeo-água, micelas poliméricas, emulsões múltiplas, auto-emulsificantes, auto- 15 microemulsificantes, ciclodextrinas e seus derivados e dendrímeros.

Composições da presente invenção são utilizáveis na composição de sólidos, semi-sólidos, pós e soluções para administração pulmonar de um composto de fórmula [Va] ou fórmula [VIa] usando, por exemplo um inalador de dose medida, inalador de pó seco e um nebulizador, 20 todos sendo dispositivos bem conhecidos do versado na técnica.

Composições da presente invenção são especificamente utilizáveis na composição de sistemas de liberação de drogas de liberação controlada, prolongada, retardada, e de liberação lenta. Mais especificamente, mas não limitado a, as composições são utilizáveis em composição de 25 liberação controlada parenteral e sistemas de liberação prolongada (ambos sistemas levando a uma redução de muitas vezes no número de administrações), bem conhecidos do versado na técnica. Ainda mais preferivelmente, são sistemas de liberação controlada e liberação retardada administrados de modo subcutâneo. Sem limitar o escopo da invenção,

exemplos de sistema de liberação controlada utilizável e composições incluem hidrogéis, géis oleaginosos, cristais líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Os métodos para produzir sistemas de liberação controlada utilizáveis para composições da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cristalização, condensação, co-cristalização, precipitação, co-precipitação, emulsificação, dispersão, homogeneização em pressão elevada, encapsulação, secagem por pulverização, microencapsulação, coacervação, separação de fase, evaporação de solvente para produzir microesferas, extrusão e processos de fluido supercrítico. A 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).

A administração parenteral pode ser realizada por injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente uma seringa de tipo de caneta. A administração parenteral pode ser realizada por meio de uma bomba de infusão. Uma outra opção é a composição que pode ser uma solução ou suspensão para a administração do composto da presente invenção na forma de uma pulverização nasal ou pulmonar. Como ainda outra opção, as composições farmacêuticas contendo o composto da invenção podem também ser adaptadas a administração transdérmica, por exemplo injeção sem agulha ou de um curativo adesivo, opcionalmente um adesivo iontoforético, ou administração transmucosal, por exemplo bucal,.

O termo “composição estabilizada” refere-se a composição com aumentada estabilidade física, aumentada estabilidade química ou aumentada estabilidade física e química.

O termo “estabilidade física” da composição de proteína como

usado aqui refere-se à tendência da proteína de formar agregados biologicamente inativos e/ou insolúveis da proteína como um resultado da exposição da proteína a estresses termo-mecânicos e/ou interação com interfaces e superfícies que são desestabilizantes, como superfícies hidrofóbicas e interfaces. A estabilidade física das composições de proteína aquosa é avaliada por meio de inspeção visual e/ou medidas de turvação após exposição da composição colocada em recipientes apropriados (por exemplo cartuchos ou frasquinhos) para estresse mecânico/ físico (por exemplo agitação) em temperaturas diferentes durante vários períodos de tempo. A inspeção visual das composições é realizada em uma luz de foco agudo com um fundo preto. A turvação da composição é caracterizada por um escore visual na faixa de grau de turvação, por exemplo em uma escala de 0 a 3 (uma composição não mostrando turvação corresponde a um escore visual 0, e uma composição mostrando turvação visual em luz do dia corresponde a um escore visual 3). Uma composição é classificada instável física com relação à agregação de proteína, quando mostra uma turvação visual na luz do dia. Alternativamente, a turvação da composição pode ser avaliada por simples medida de turvação bem conhecida do versado. A estabilidade física das composições de proteína aquosas também pode ser avaliada por uso de um agente espectroscópico ou sonda do estado conformacional da proteína. A sonda é preferivelmente uma molécula pequena que preferivelmente liga a um confôrmero não nativo da proteína. Um exemplo de uma sonda espectroscópica molecular pequena de estrutura de proteína é Tioflavina T. Tioflavina T é um corante fluorescente que tem sido amplamente usado para a detecção de fibrilas amilóides. Na presença de fibrilas, e talvez outras configurações de proteína também, Tioflavina T dá lugar a um novo máximo de excitação em cerca de 450 nm e uma emissão melhorada abertura 482 nm quando ligada a uma forma de proteína fibrila. A Tioflavina T não ligada é essencialmente não fluorescente nos comprimentos de onda.

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 "porção hidrofóbica" que ligam preferivelmente a porções hidrofóbicas expostas de uma proteína. As porções hidrofóbicas são
5 geralmente enterradas dentro da estrutura terciária de uma proteína em seu estado nativo, mas se torna exposta como uma proteína que começa a desdobrar ou desnaturar. Os exemplos destas sondas espectroscópicas moleculares pequenas são corantes aromáticos, hidrofóbicos, como antraceno, acridina, fenantrolina ou outros. Outras sondas espectroscópicas são
10 complexos de metal- aminoácido, como complexos de metal cobalto de aminoácidos hidrofóbicos, como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina e valina, ou outros.

O termo "estabilidade química" da composição de proteína como usado aqui refere-se a mudanças covalentes químicas na estrutura da
15 proteína levando a formação de produtos de degradação química com potência biológica menos potencial e/ou propriedades imunogênicas aumentadas potenciais comparadas com a estrutura de proteína nativa. Vários produtos de degradação química podem ser formados dependendo do tipo e natureza da proteína nativa e o meio em que a proteína é exposta. A
20 eliminação de degradação química pode mais provavelmente não ser completamente evitada e quantidades crescentes de produtos de degradação química são vistas com frequência durante o armazenamento e uso da composição de proteína, como bem conhecido do versado na técnica. A maior parte das proteínas são passíveis de desamidação, um processo em que o
25 grupo amida de cadeia lateral em resíduos de glutaminila ou asparaginila é hidrolisado para formar um ácido carboxílico livre. Outras vias de degradação envolvem a formação de produtos de transformação de peso molecular elevado, onde duas ou mais moléculas de proteína são covalentemente ligadas uma na outra através de transamidação e/ou interações dissulfeto levando a

formação de dímero covalentemente ligado, produtos de degradação de polímero e oligômero (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Oxidação (de por exemplo resíduos de metionina) pode ser mencionada como outra variante de

5 degradação química. A estabilidade química da composição de proteína pode ser avaliada por medida da quantidade dos produtos de degradação química em vários pontos do tempo após exposição a diferentes condições ambientais (a formação de produtos de degradação pode com freqüência ser acelerada por exemplo aumento da temperatura). A quantidade de cada produto de

10 degradação individual é com freqüência determinada por separação dos produtos de degradação dependendo do tamanho de molécula e/ou carga usando várias técnicas de cromatografia (por exemplo SEC-HPLC e/ou RP-HPLC).

Assim, como descrito acima, a “composição estabilizada”

15 refere-se a composição com aumentada estabilidade física, aumentada estabilidade química ou aumentada estabilidade física e química. Em general, a composição deve ser estável durante uso e armazenamento (de acordo com condições recomendadas de uso e armazenamento) até o prazo de validade ser alcançado.

20 Em uma forma de realização da invenção, as composições farmacêuticas compreendendo um composto da presente invenção são estáveis por mais do que 6 semanas de uso e por mais do que 3 anos de armazenamento.

Em outra forma de realização da invenção, as composições

25 farmacêuticas compreendendo o composto da presente invenção é estável por mais do que 4 semanas de uso e por mais do que 3 anos de armazenamento.

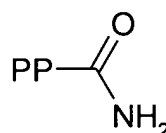
Em uma outra forma de realização da invenção, as composições farmacêuticas compreendendo o composto da presente invenção são estáveis por mais do que 4 semanas de uso e por mais do que dois anos de

armazenamento.

Em ainda uma outra forma de realização da invenção, as composições farmacêuticas compreendendo o composto da presente invenção são estáveis por mais do que 2 semanas de uso e por mais do que dois anos de armazenamento.

O seguinte é uma lista numerada das formas de realização e não deve ser construída como limitando a invenção:

Forma de realização 1. Um método para fixar covalentemente PEG a um polipeptídeo compreendendo pelo menos um resíduo de glutamina, referido método compreende reagir, em uma ou mais etapas, este resíduo de glutamina compreendendo polipeptídeo representado por fórmula [I]



[I]

em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no polipeptídeo, com um nucleófilo contendo nitrogênio de fórmula

[II]



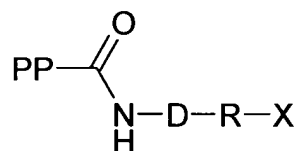
[II]

em que D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação única;

R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, ou C_{5-15} heteroalquilenos;

X representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona;

na presença de transglutaminase para formar um polipeptídeo transaminado de fórmula [III]



[III]

opcionalmente, se X é um grupo latente, transformar referido grupo latente em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona,

referido polipeptídeo transaminado sendo ainda reagido com um segundo composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

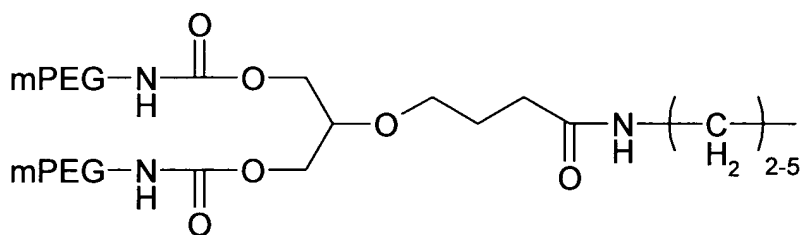
5

em que Y,

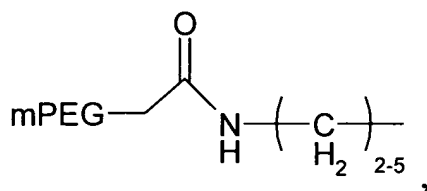
se X representa um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em um aldeído ou uma cetona, representa $-\text{O}-\text{NH}_2$; ou,

10 se X representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-\text{O}-\text{NH}_2$, representa um aldeído ou uma cetona; e

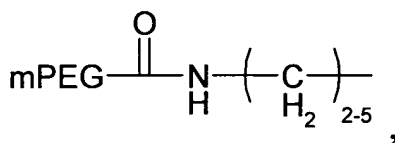
Z representa uma porção selecionada dentre



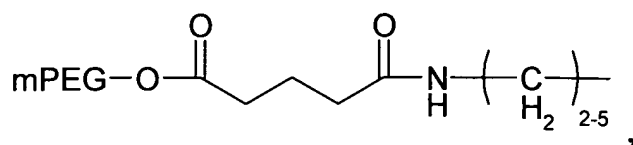
,



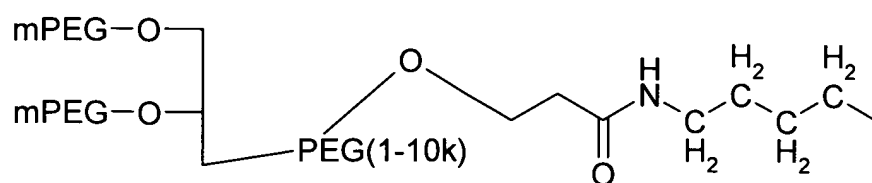
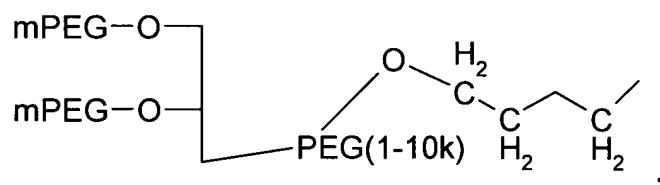
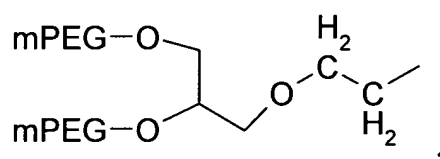
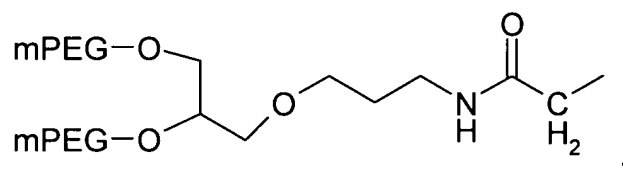
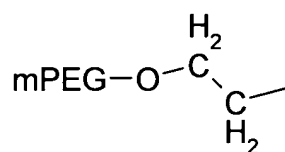
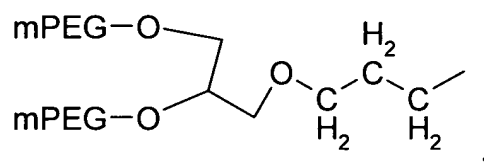
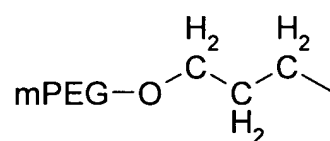
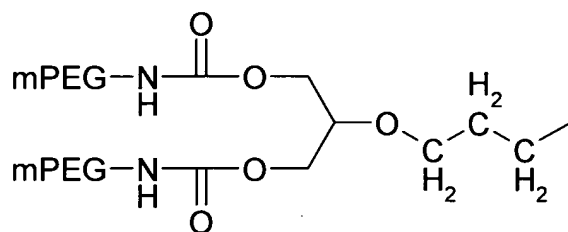
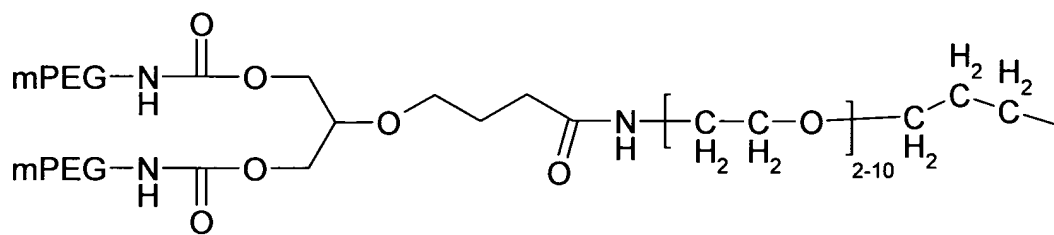
,

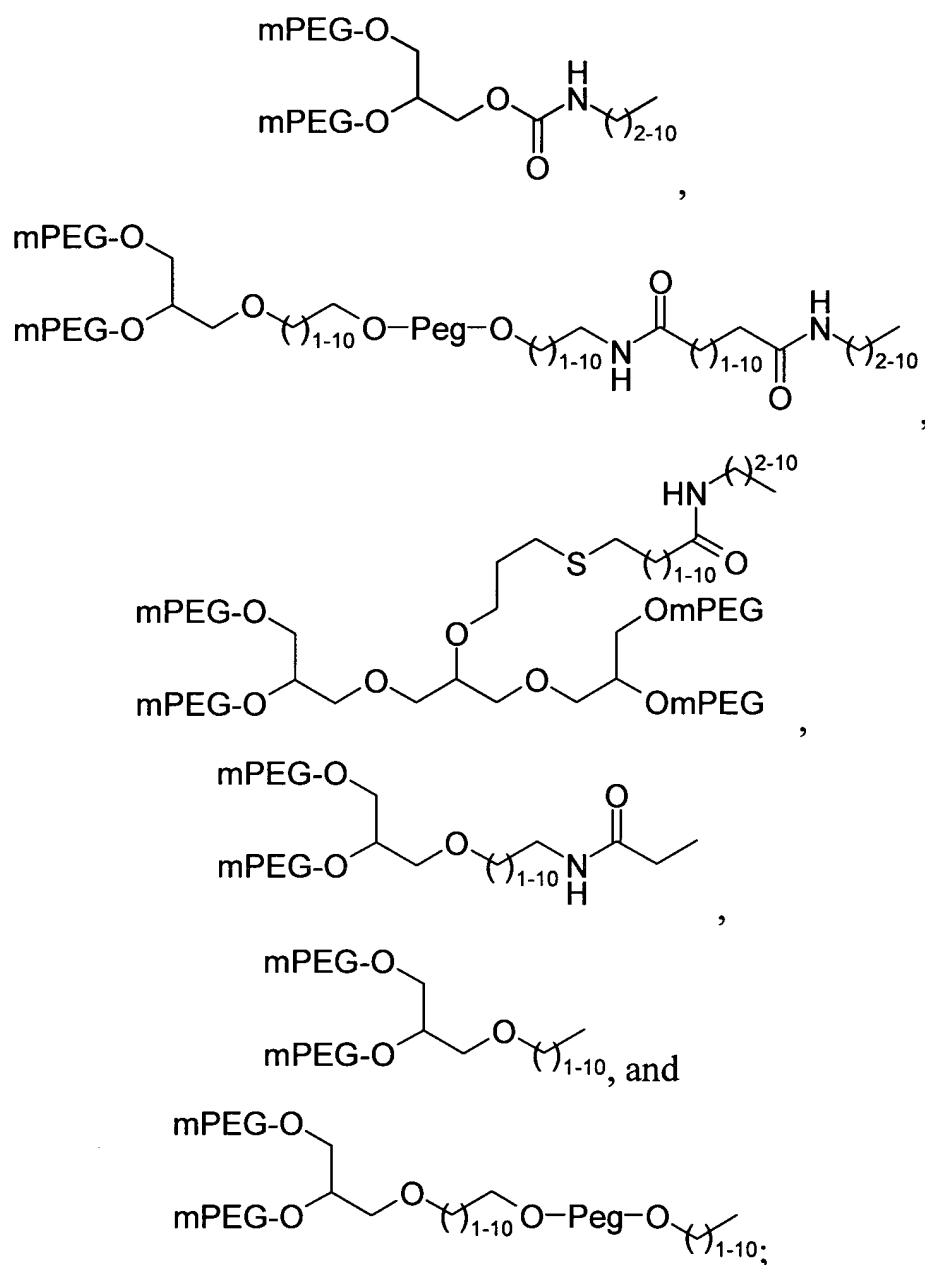


,



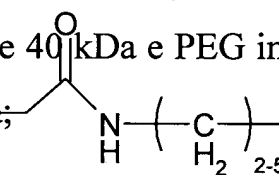
,





em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

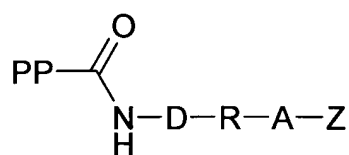
desde que se Z é



, então PEG é 10

5 kDa PEG

para formar um PEGuilado polipeptídeo de fórmula [V]



[V]

em que A representa uma ligação oxima;

ou qualquer sal, pró-droga ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo.

5 Forma de realização 2. Método de acordo com a forma de realização 1, em que D representa -O-.

Forma de realização 3. Método de acordo com a forma de realização 1, em que D representa uma ligação única.

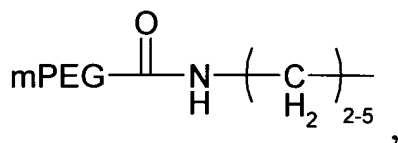
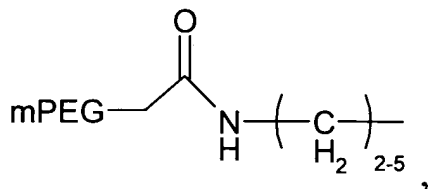
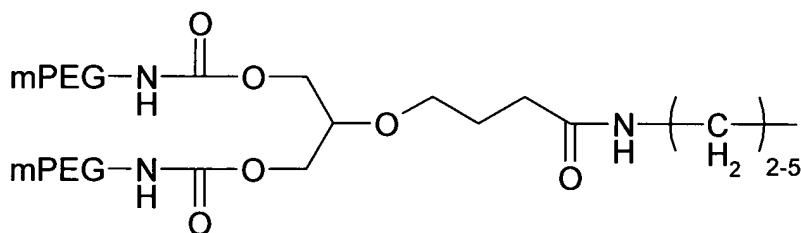
10 Forma de realização 4. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 3, em que R representa $-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-CH_2-$ ou $-(CH_2)_4-CH(NHCOCH_3)-CO-NH-CH_2-$.

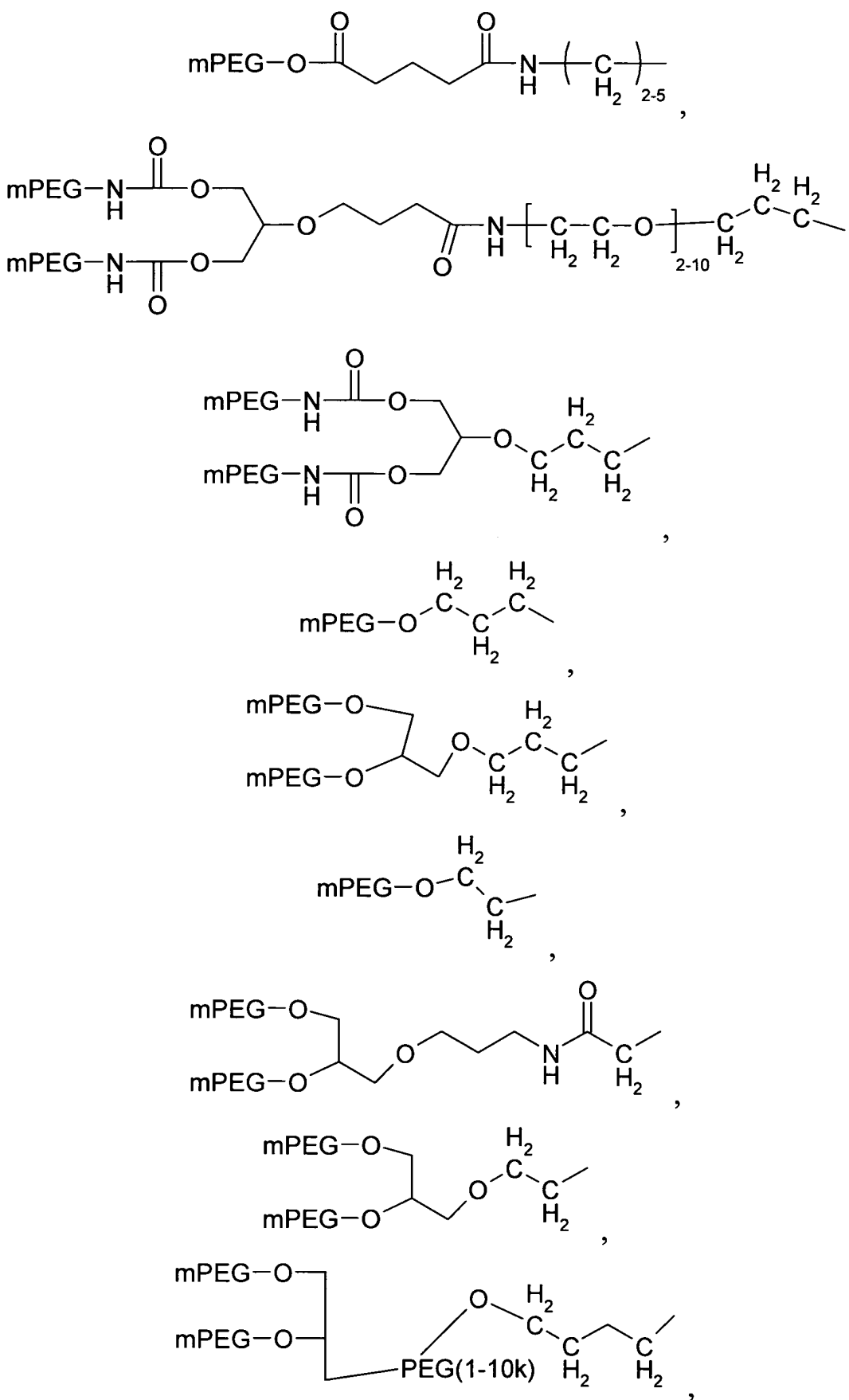
Forma de realização 5. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 3, em que R representa C_{1-6} alquilenos.

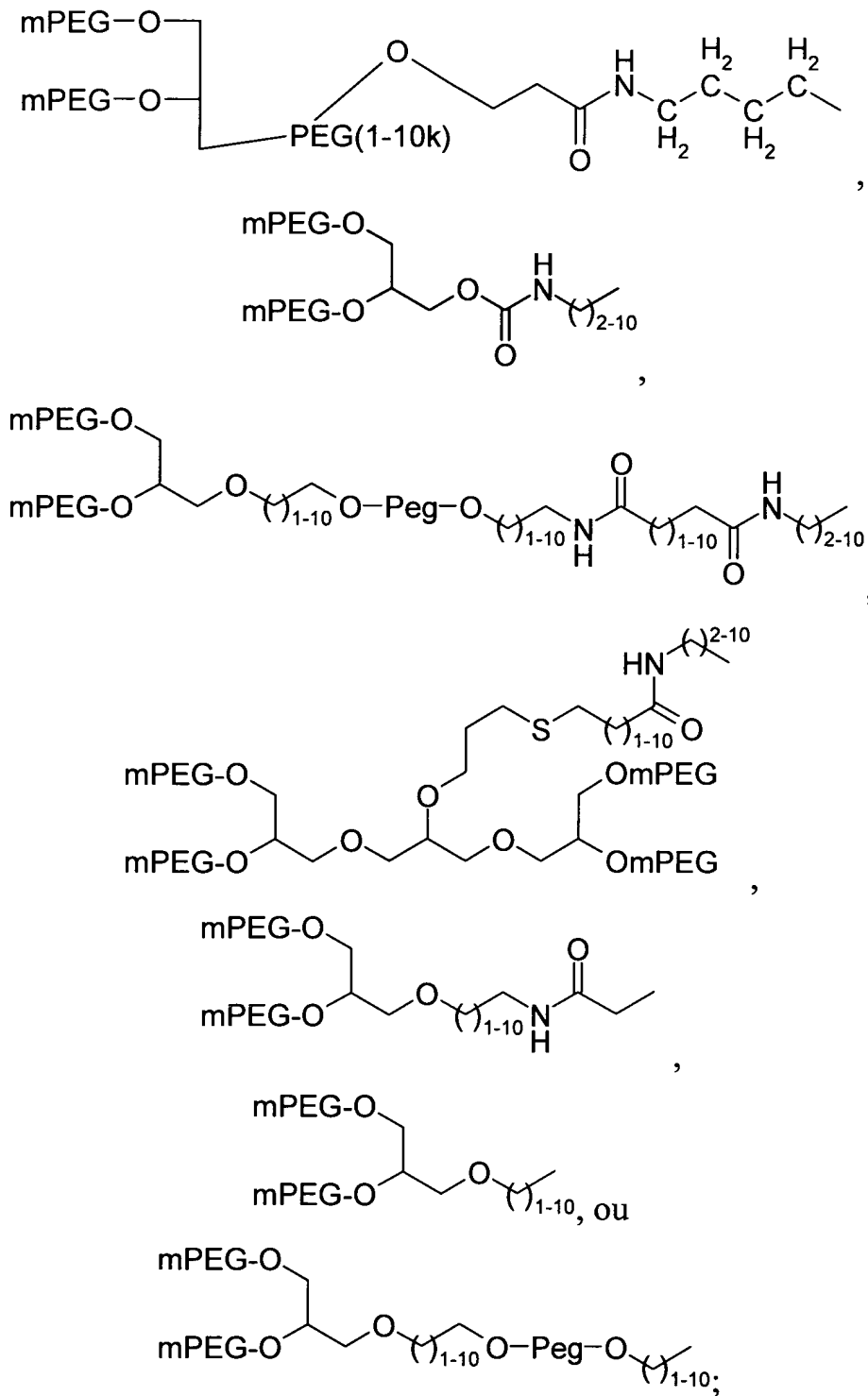
Forma de realização 6. Método de acordo com a forma de realização 5, em que R representa C_{1-3} alquilenos.

15 Forma de realização 7. Método de acordo com a forma de realização 6, em que R representa metileno ou propileno.

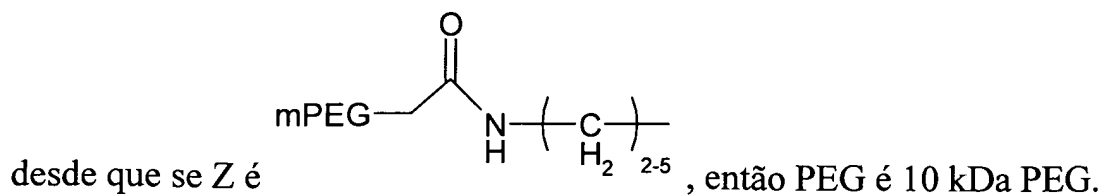
Forma de realização 8. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 7, em que Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



Forma de realização 9. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$ e X representa um aldeído ou um grupo latente, que pode ser ainda reagido para formar um aldeído.

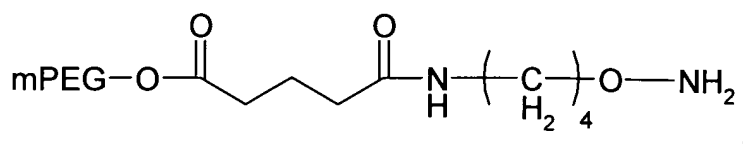
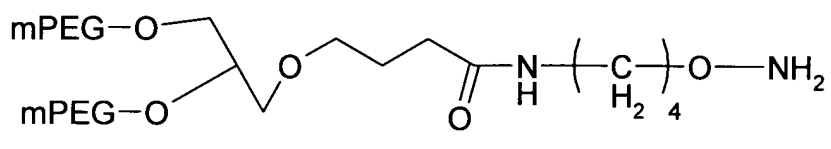
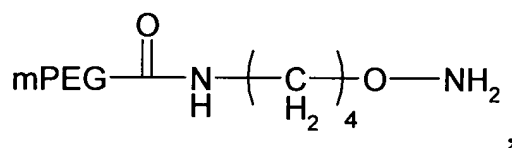
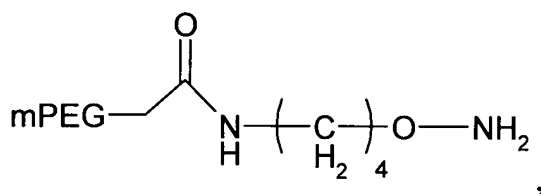
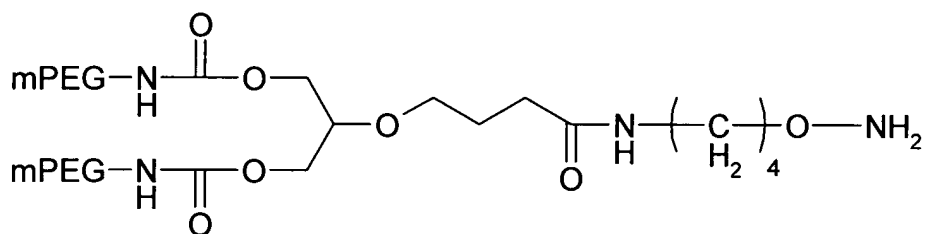
5 Forma de realização 10. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$ e X representa uma cetona ou um grupo latente que pode ser ainda reagido para formar uma cetona.

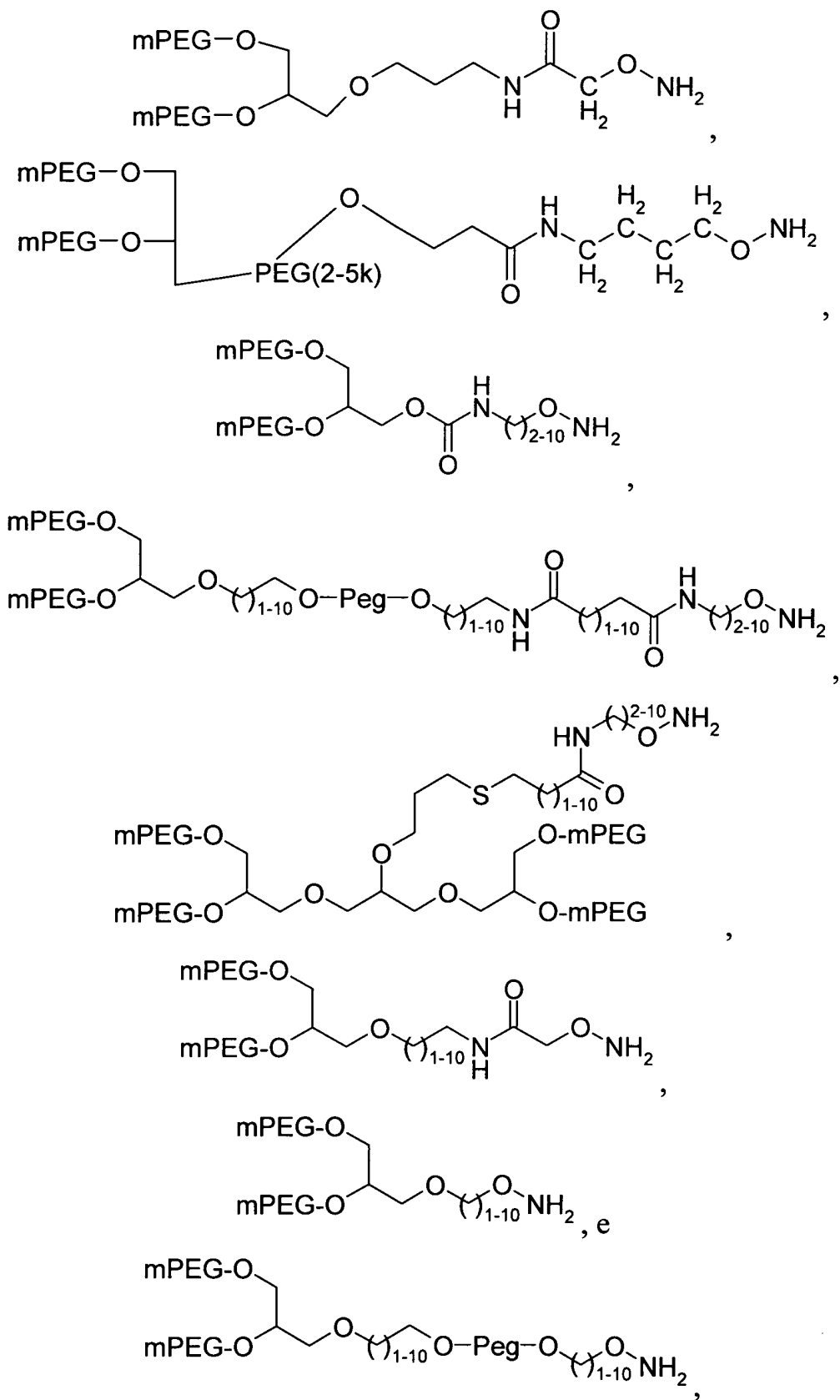
10 Forma de realização 11. Método de acordo com a forma de realização 9 ou forma de realização 10, em que o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre





em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

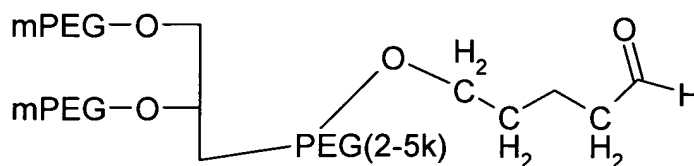
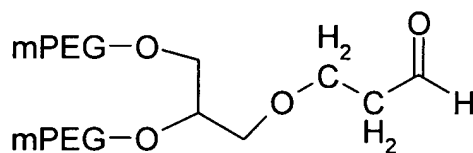
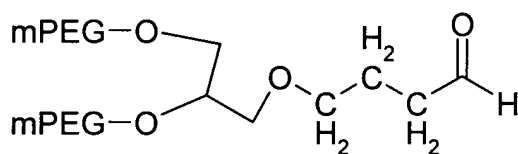
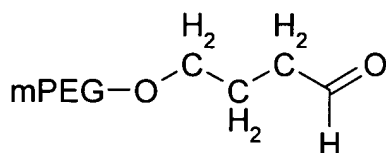
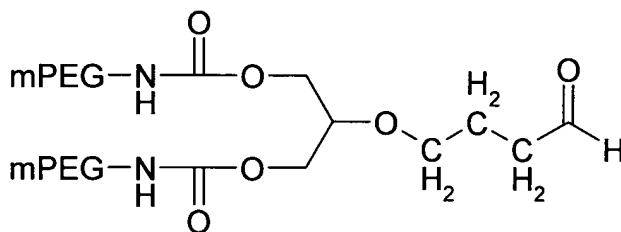
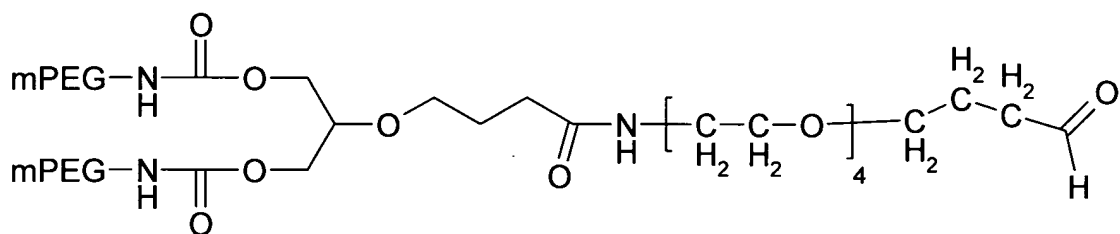
Forma de realização 12. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que Y representa um aldeído e X representa -O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂.

5 Forma de realização 13. Método de acordo com a forma de
realização 12, em que o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre



em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG

com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

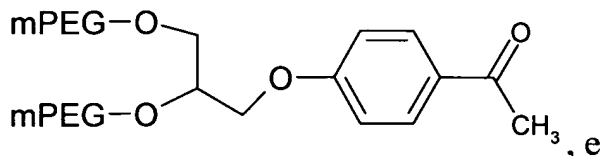
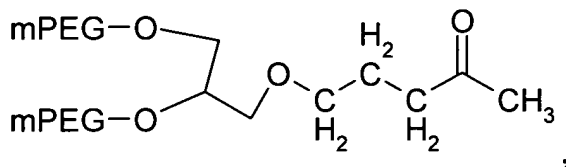
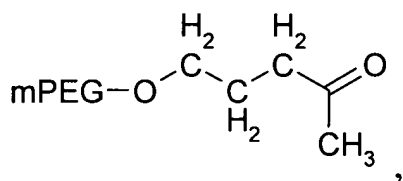
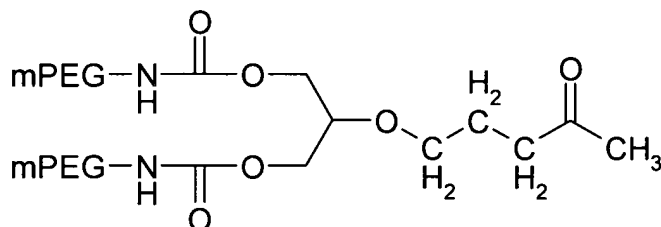
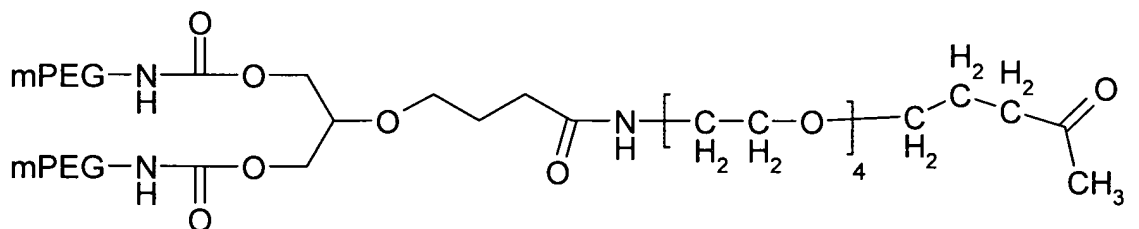
5 Forma de realização 14. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que Y representa uma cetona e X representa -O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂.

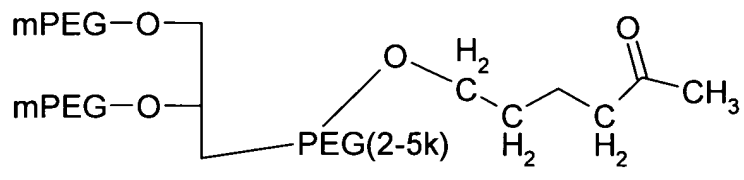
Forma de realização 15. Método de acordo com a forma de realização 14, em que o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre





em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

5 Forma de realização 16. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que o composto de fórmula [II]



[II]

representa 1,3-diamino-2-propanol, e

Y representa -O-NH₂.

10 Forma de realização 17. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 8, em que o composto de fórmula [II]



[II]

representa 1,3-diaminoóxi propano, e

Y representa um aldeído.

15 Forma de realização 18. Um método de modificar as propriedades farmacológicas de hormônio de crescimento, o método compreendendo covalentemente fixar PEG em referido hormônio de crescimento de acordo com um método de qualquer uma das formas de realização 1 a 17.

20 Forma de realização 19. Método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 18, em que o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de -C(=O)-NH₂ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de

crescimento.

Forma de realização 20. Método de acordo com a forma de realização 19, em que referido resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representa um hormônio de crescimento humano.

5 Forma de realização 21. Método de acordo com a forma de realização 20, em que referido resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representa

a) um hGH compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID No.1,

10 b) 20 kDa hGH,

c) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido,

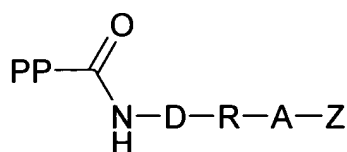
15 d) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, ou

20 e) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido, e onde um resíduo de glutamina está presente em outra posição no hormônio de crescimento.

Forma de realização 22. Método de acordo com a forma de realização 21, em que referido hormônio de crescimento representa hGH.

Forma de realização 23. Composto de acordo com a fórmula

25 [V]



[V]

em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por

remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no polipeptídeo;

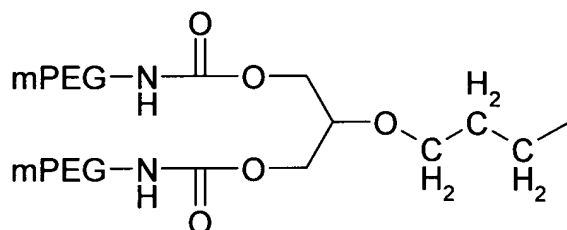
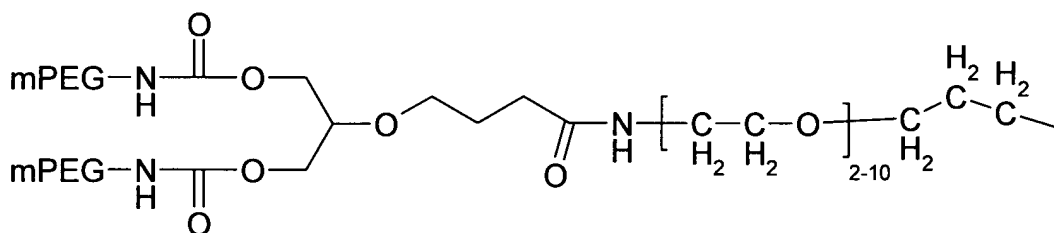
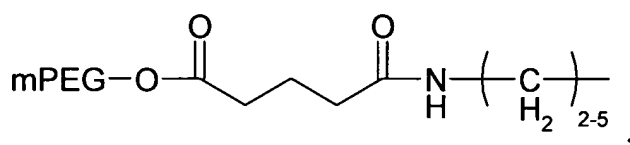
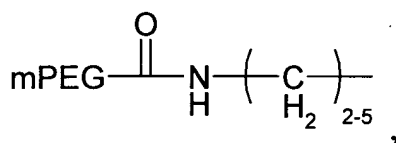
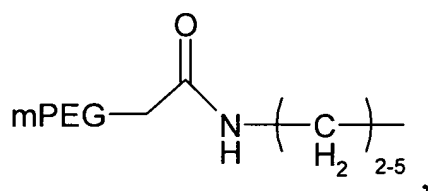
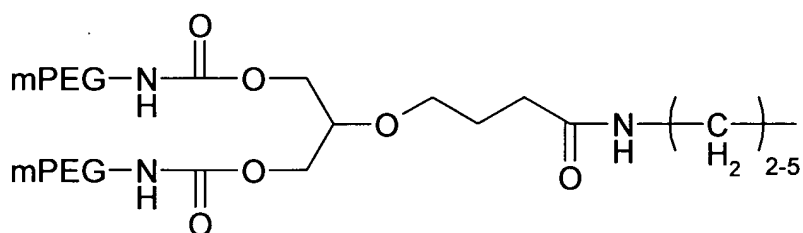
D representa $-O-$ ou uma ligação;

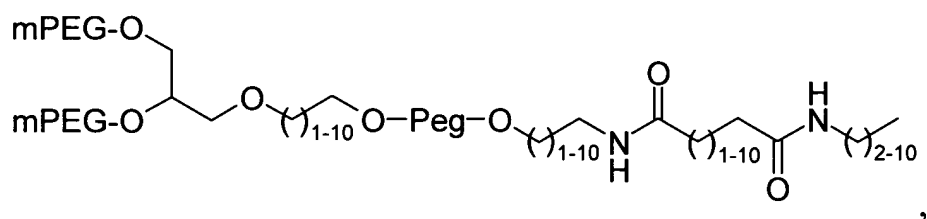
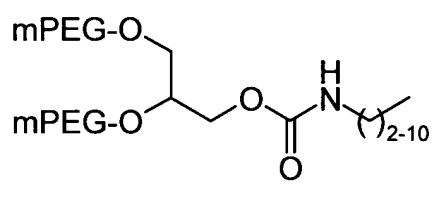
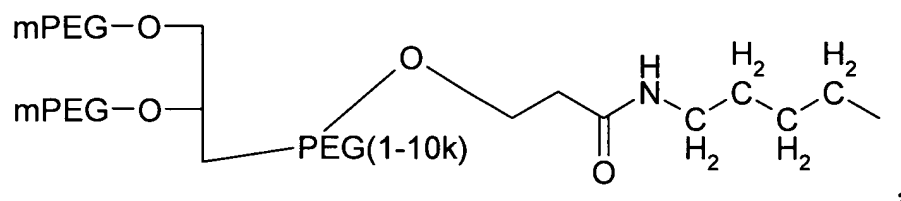
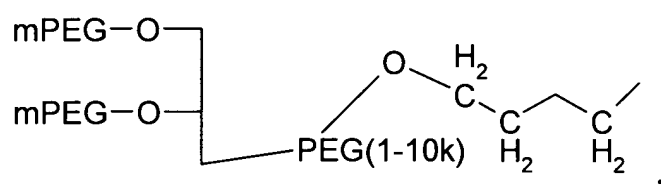
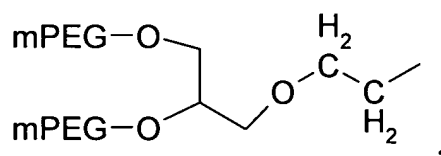
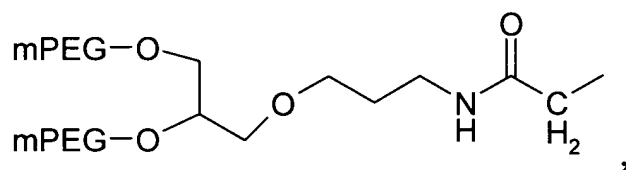
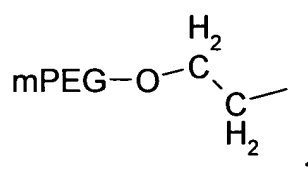
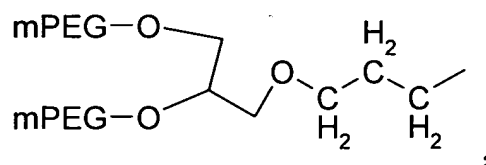
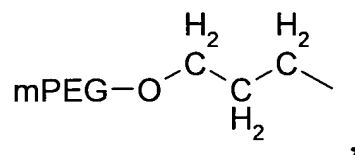
R representa C_{1-6} alquilenos, $-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-NH-CH_2-$, -

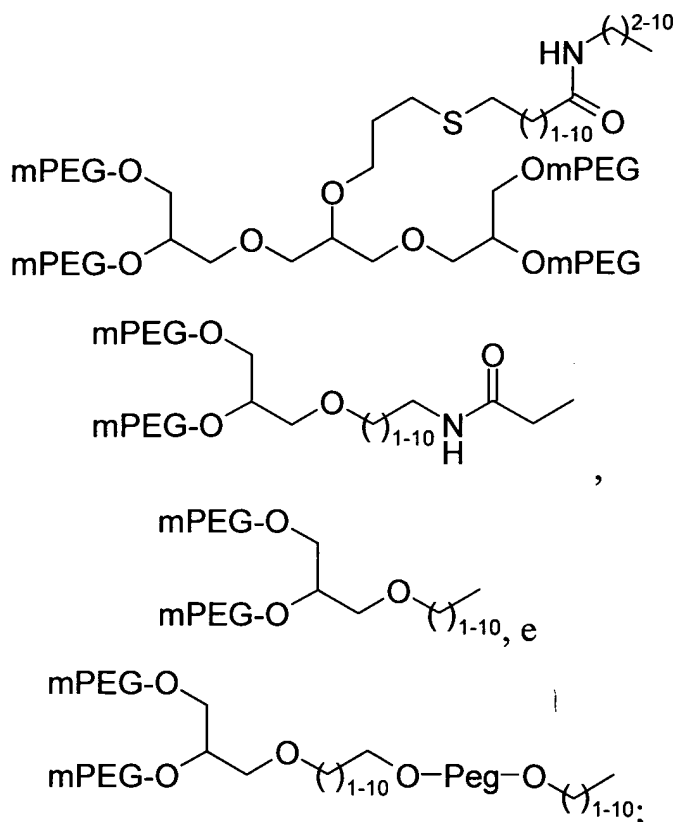
5 $(CH_2)_4-CH(NHCOCH_3)-CO-NH-CH_2-$ ou C_{5-15} heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

Z representa uma porção selecionada dentre



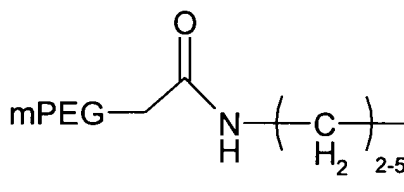




em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis do

5 mesmo;



desde que se Z é , então mPEG é 10 kDa mPEG.

Forma de realização 24. Composto de acordo com a forma de realização 23, em que D representa -O-.

Forma de realização 25. Composto de acordo com a forma de realização 23, em que D representa uma ligação única.

10 Forma de realização 26. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 23 a 25, em que R representa -(CH₂)₄-CH(NH₂)-CO-NH-CH₂- ou -(CH₂)₄-CH(NHCOCH₃)-CO-NH-CH₂-.

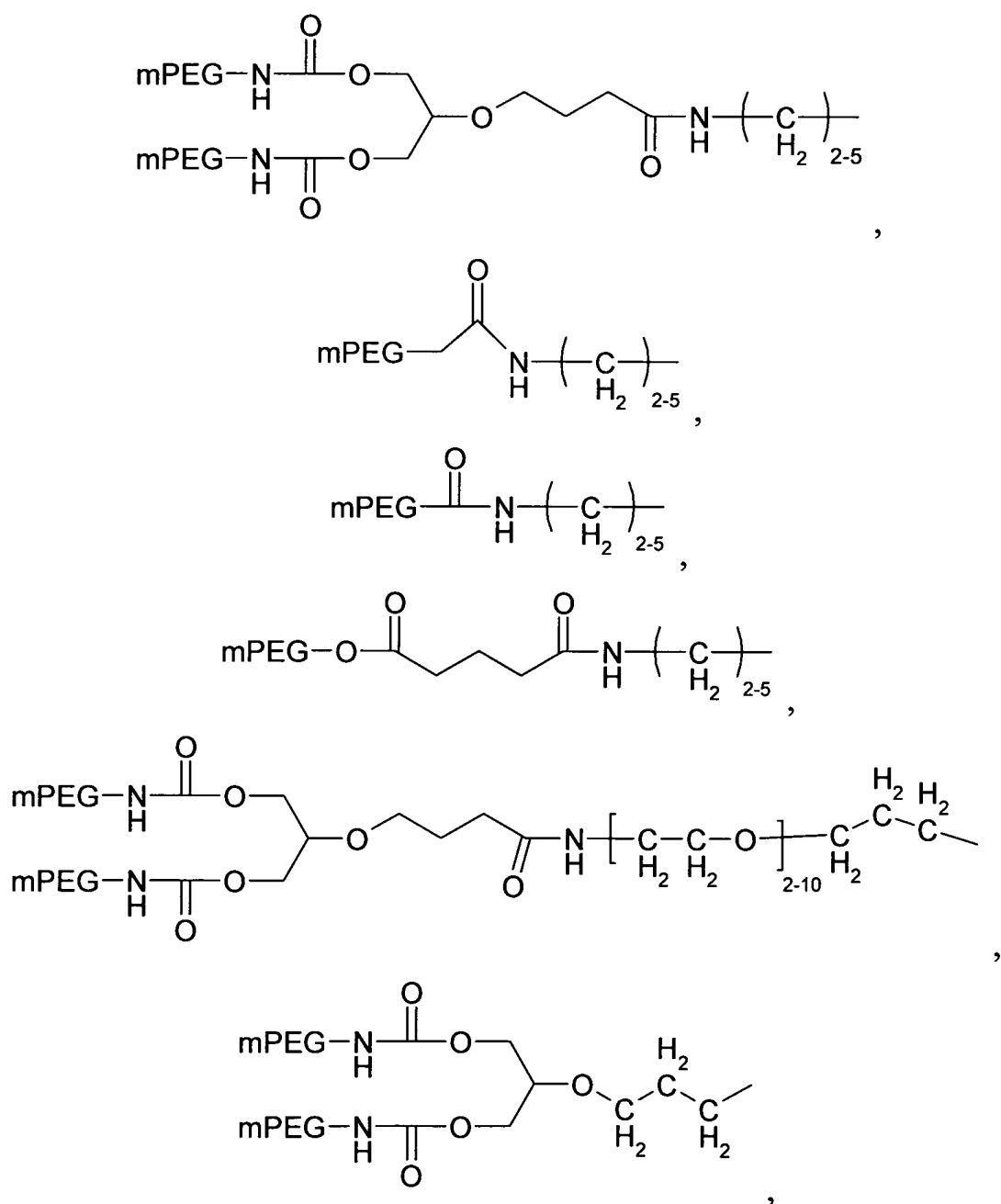
Forma de realização 27. Composto de acordo com qualquer

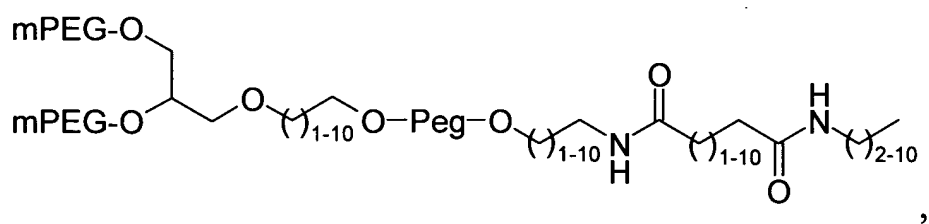
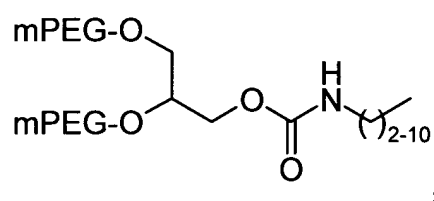
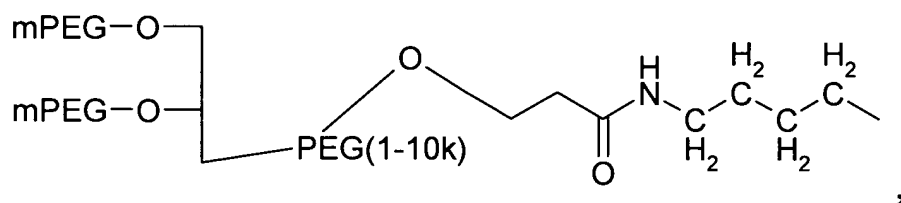
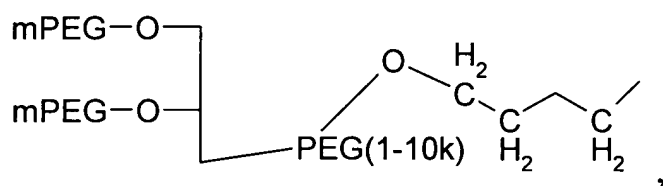
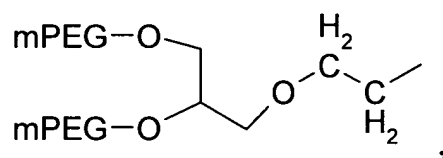
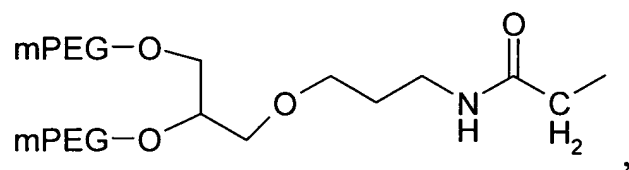
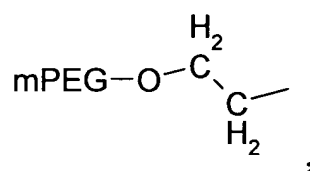
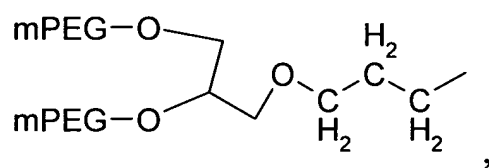
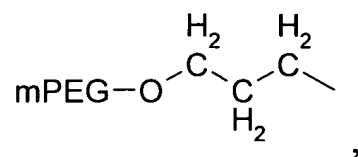
uma das formas de realização 23 a 25, em que R representa C₁₋₆alquilenos.

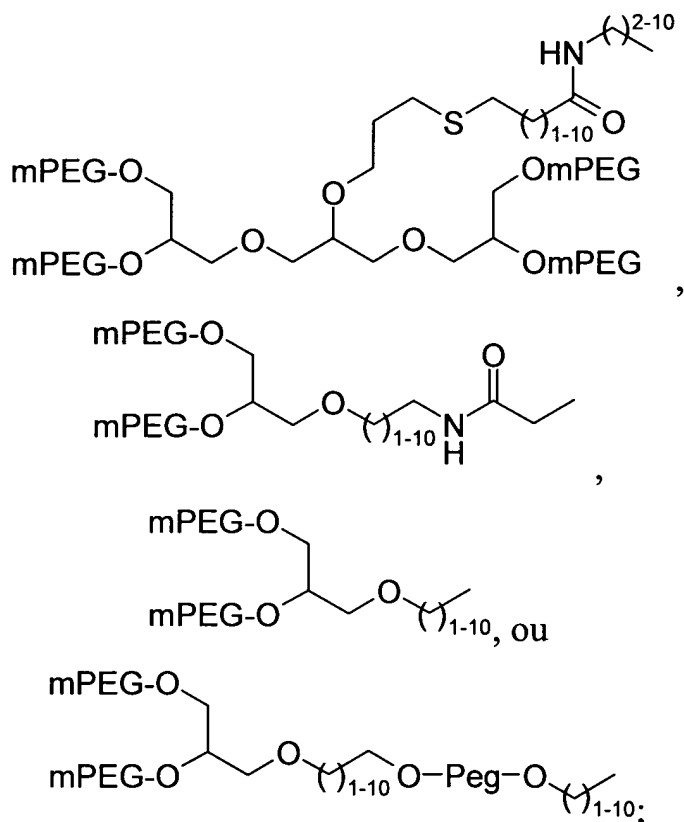
Forma de realização 28. Composto de acordo com a forma de realização 27, em que R representa C₁₋₃alquilenos.

5 Forma de realização 29. Composto de acordo com a forma de realização 28, em que R representa metileno ou propileno.

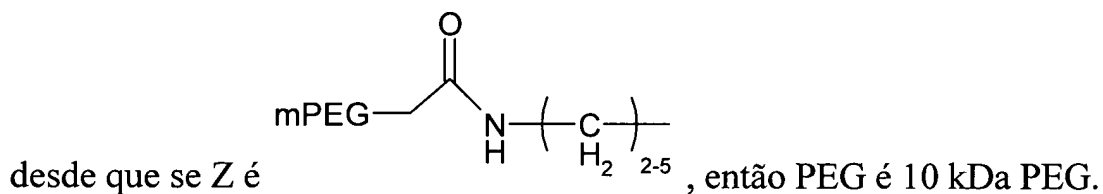
Forma de realização 30. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 23 a 29, em que Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



Forma de realização 31. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 23 a 30, em que o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento.

Forma de realização 32. Composto de acordo com a forma de realização 31, em que GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em um hGH compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

Forma de realização 33. Composto de acordo com a forma de realização 31, em que GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em 20 kDa hGH.

5 Forma de realização 34. Composto de acordo com a forma de realização 31, em que GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de

a) o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1; ou

10 b) o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido;

ou

25 GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em uma posição diferente da posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 e diferente da posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID

No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido..

Forma de realização 35. Composto de acordo com a forma de realização 23 selecionado dentre

- 5 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;
- 10 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)oximino)etil hGH;
- 15 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;
- 20 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi
- 25 hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;
 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;
- 5 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)oximino)etil hGH;
- 10 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi
- 15 hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;
- 20 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)
- 25 ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;
- $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
5 butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

10 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)
15 propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)
propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)prop-1-iloxi)
PEGuiloxi} butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

20 $N^{\delta 141/40}$ -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)
butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)
prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril} aminobutil)
25 oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
5 butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-
bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-minobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-

iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-

5 iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)

propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)

propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}

15 aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-

iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil}

aminobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno}aminoxil)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-

iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

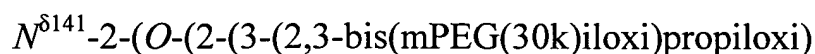
25 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-

iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi

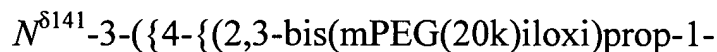
hGH;



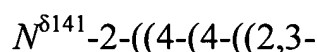
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



5 iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

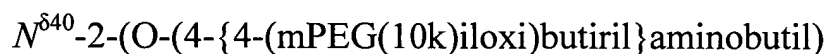


il)PEGuiloxi}butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

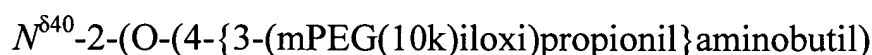


bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

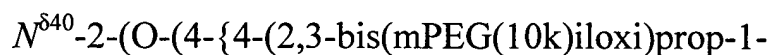
10 $N^{\delta 40}-2-(O-(4-(\{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril\}-aminobutil)oximino)etil hGH;$



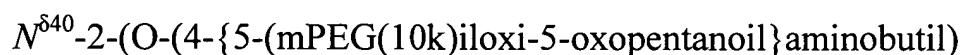
oximino)etil hGH;



15 oximino)etil hGH;



iloxi)butiril\}aminobutil)oximino)etil hGH;

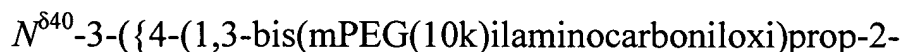


oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 40}-3-(\{4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)$

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

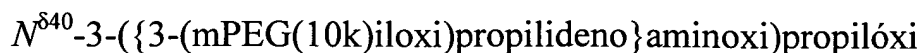


iloxi)butilideno\}-aminoxi)propilóxi hGH;

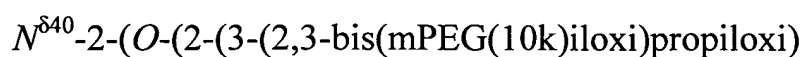
25 $N^{\delta 40}-3-(\{4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno\}aminoxi)propilóxi$
hGH;



iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;



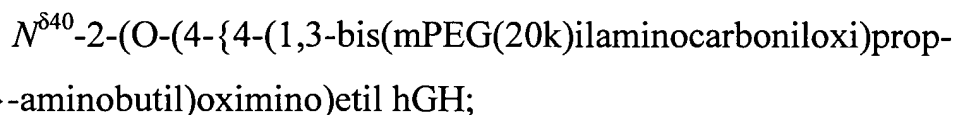
hGH;



propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



5 iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



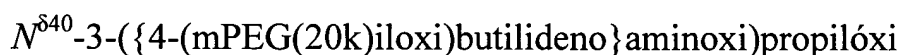
$N^{\delta 40}-2-(O-(4-\{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil\} aminobutil)oximino)etil hGH;$

10 $N^{\delta 40}-2-(O-(4-\{4-(2,3\text{-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}\} aminobutil)oximino)etil hGH;$

$N^{\delta 40}-2-(O-(4-\{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil\} aminobutil)oximino)etil hGH;$

15 $N^{\delta 40}-3-(\{4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3\text{-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;$

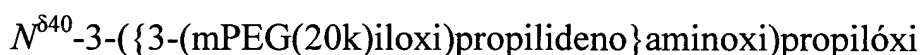
$N^{\delta 40}-3-(\{4-(1,3\text{-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}\}-aminoxi)propilóxi hGH;$



20 hGH;



butilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



hGH;

25 $N^{\delta 40}-2-(O-(2-(3-(2,3\text{-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)}$
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;



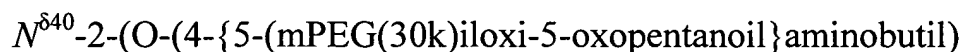
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;



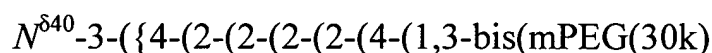
aminobutil)oximino)etil hGH;



5 butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;



oximino)etil hGH;

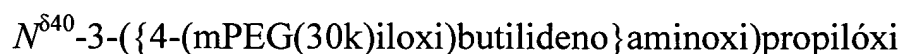


ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

10 butilideno}aminoxil)prop-1-ilóxi hGH;



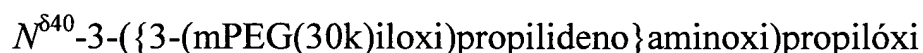
iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;



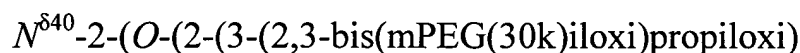
hGH;

15 $N^{\delta 40}-3-(\{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)$

butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;



hGH;



20 propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;



propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;



PEGuiloxi}butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

25 $N^{\delta 40}-2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)$

butirilamino)butil)oximino)etil hGH;



propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;



butil)oxiimino)-etil] hGH;

$N^{\circ}141$ -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)

ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno)aminoxi)propiloxi) hGH;

5 $N^{\circ}141$ -[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)propiloxycarbonilamino)
etiloximino)etil] hGH;

$N^{\circ}141$ -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-
oxoetil)oximino)etil] hGH;

10 $N^{\circ}141$ -[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-
propiloxi)butilideno)aminoxi)propiloxiimino)etil] hGH;

$N^{\circ}141/40$ -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-
2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

$N^{\circ}141/40$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-
butil)oxiimino)-etil] hGH;

15 $N^{\circ}141/40$ -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)
ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno)aminoxi)propiloxi) hGH;

$N^{\circ}141/40$ -[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)
propiloxycarbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

20 $N^{\circ}141/40$ -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-
oxoetil)oximino)etil] hGH;

$N^{\circ}141/40$ -[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-
2-propiloxi)butilideno)aminoxi)propiloxiimino)etil] hGH;

25 $N^{\circ}40$ -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-
propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

$N^{\circ}40$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-
butil)oxiimino)-etil] hGH;

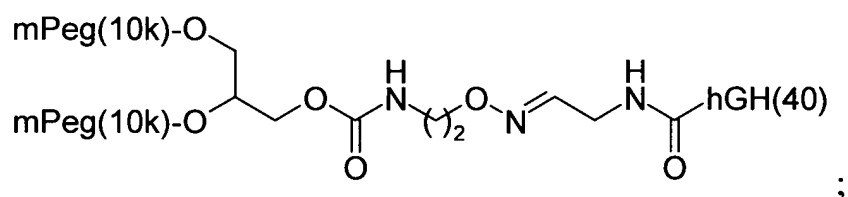
$N^{\circ}40$ -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)
ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno)aminoxil)propiloxil) hGH;

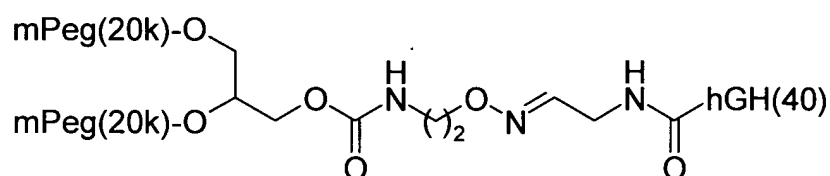
N^{ϵ} 40-[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxil)propiloxil)carbonilaminoxil)etil) hGH;

5 N^{ϵ} 40-[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxil)etilaminoxil)-2-oxoetil)oximinoxil)etil) hGH;

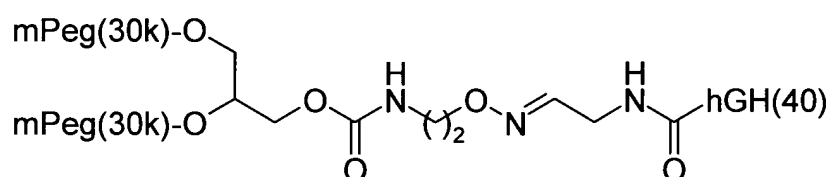
N^{ϵ} 40-[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxil)-2-propiloxil)butilideno)aminoxil)propiloxil)iminoxil)etil) hGH;



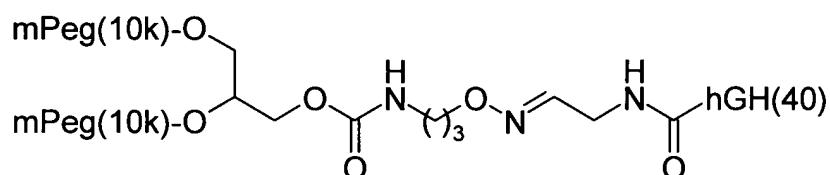
;



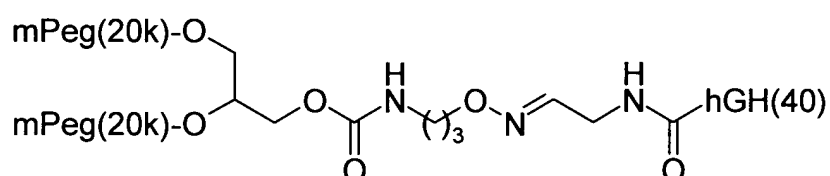
;



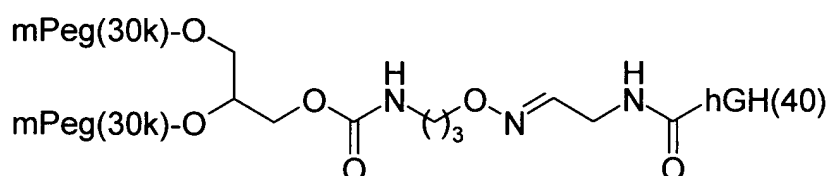
;



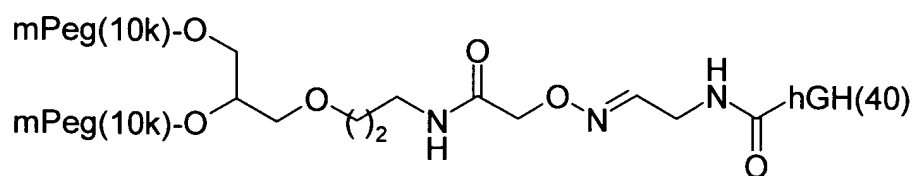
;



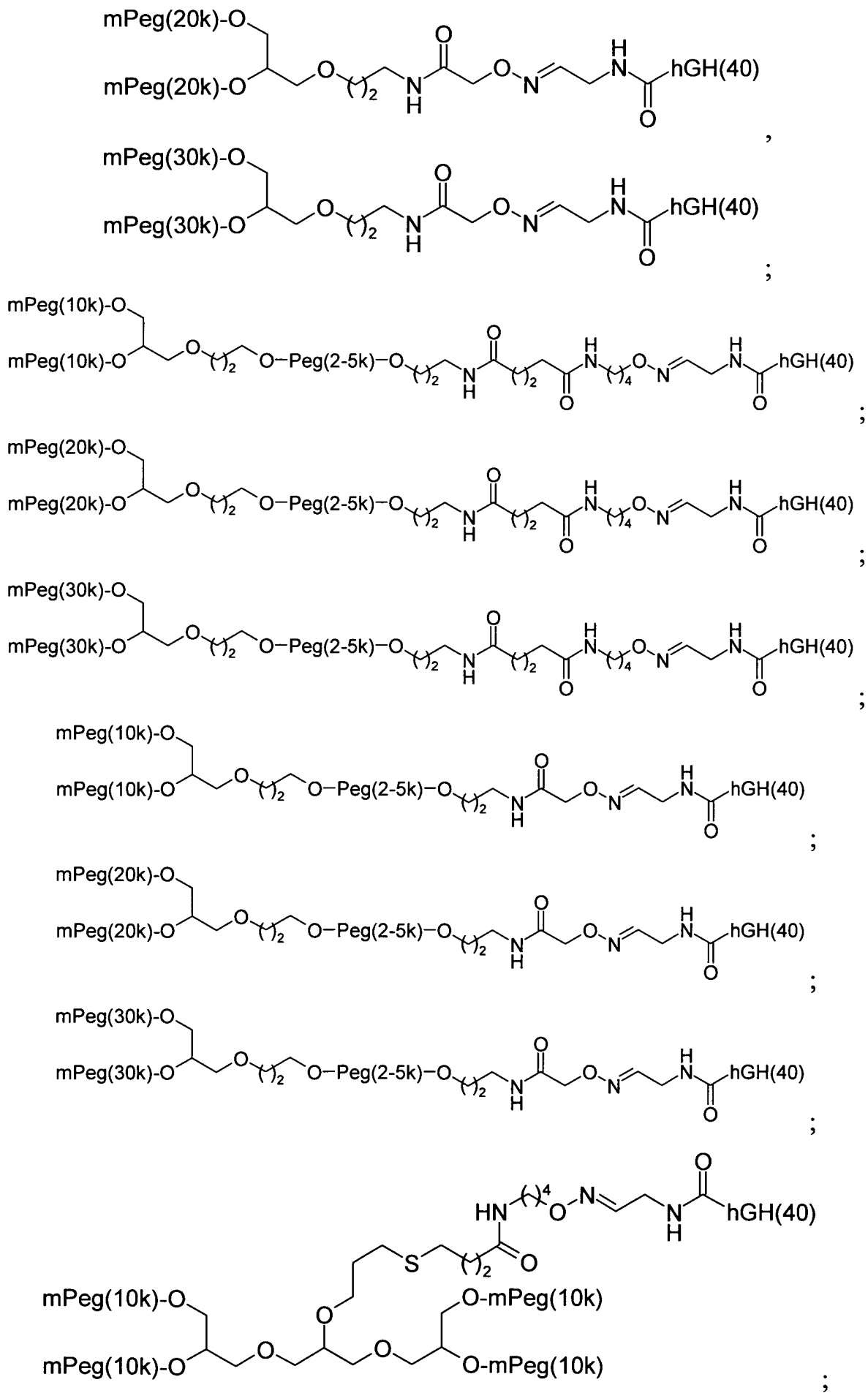
;

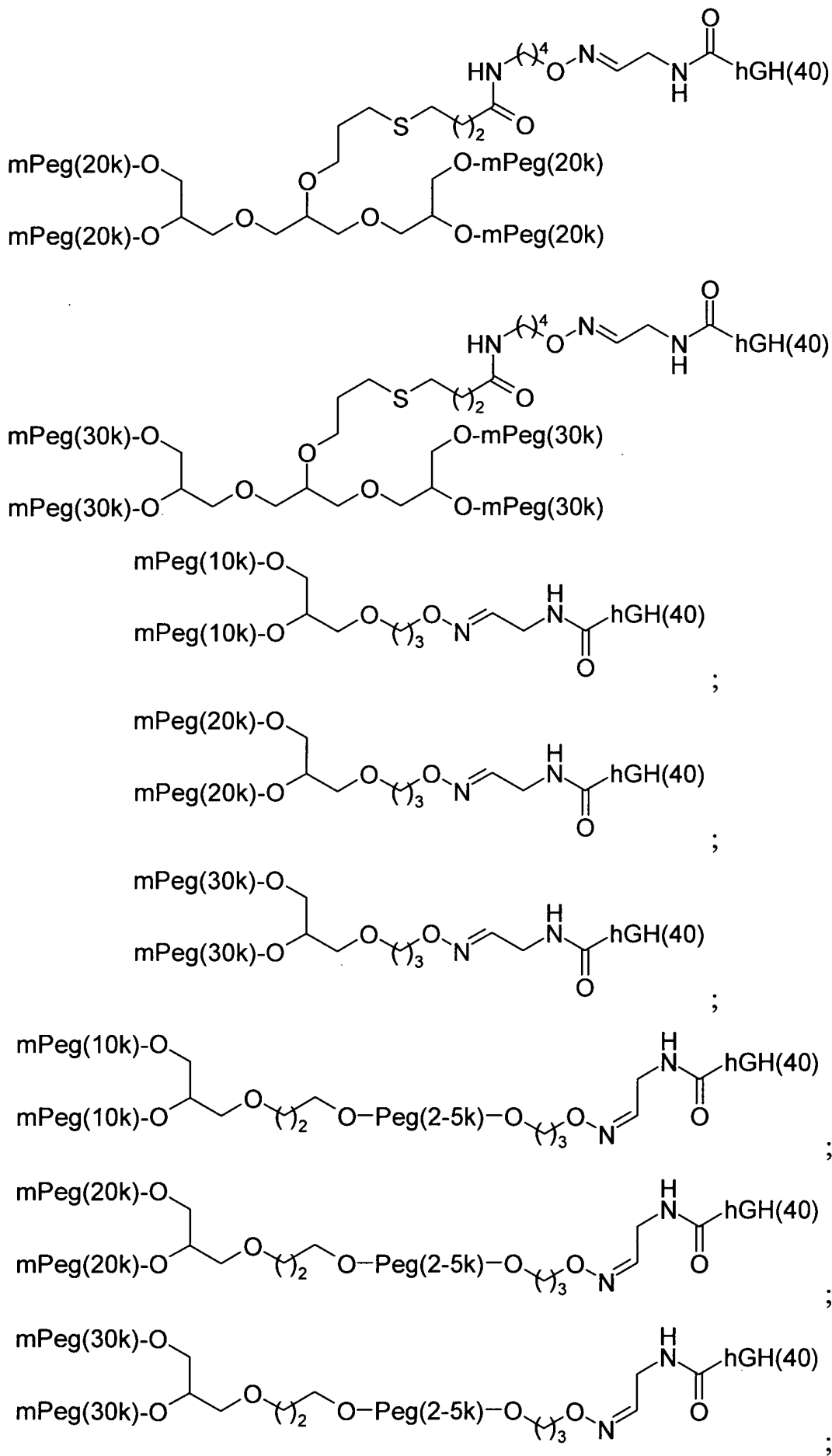


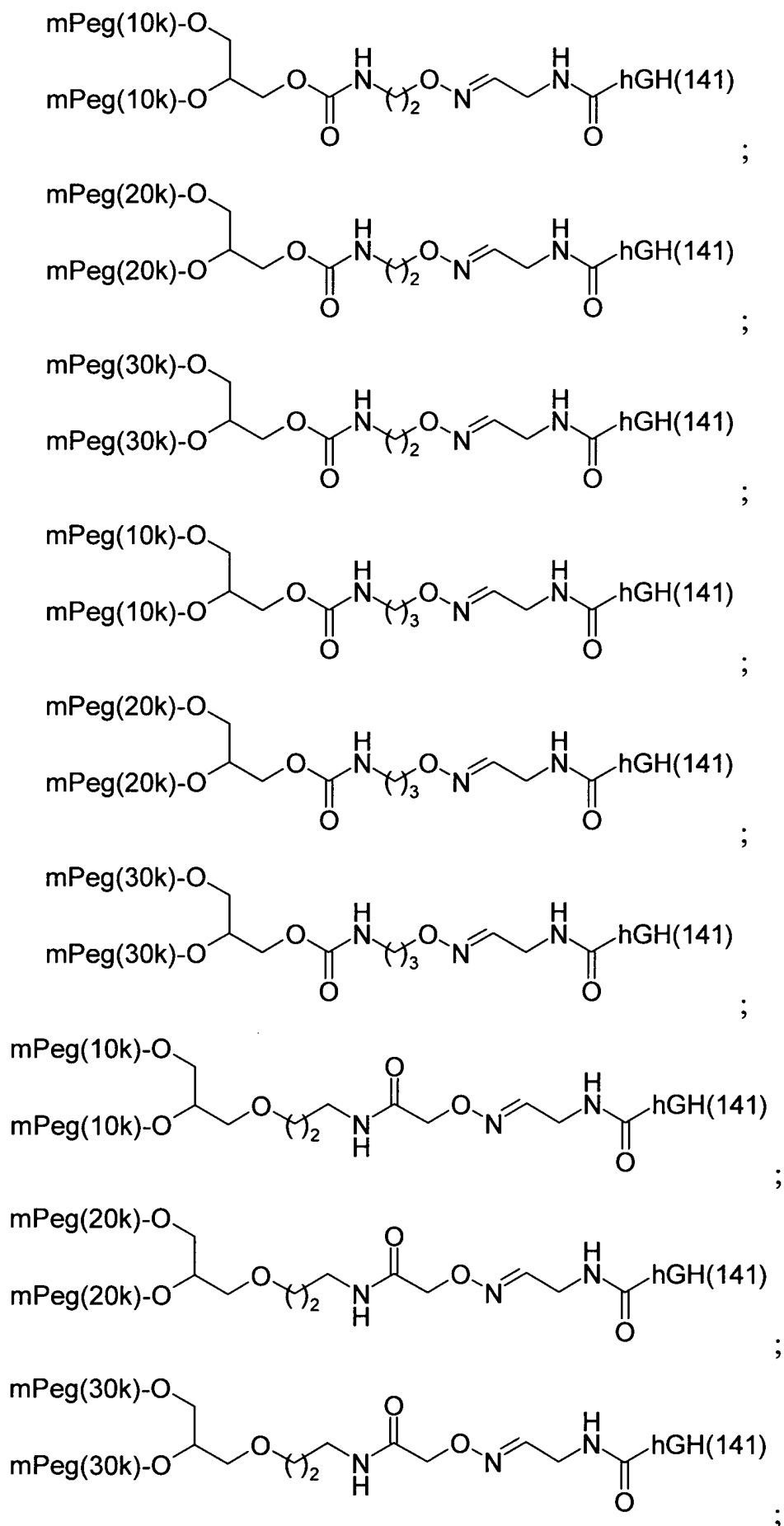
;

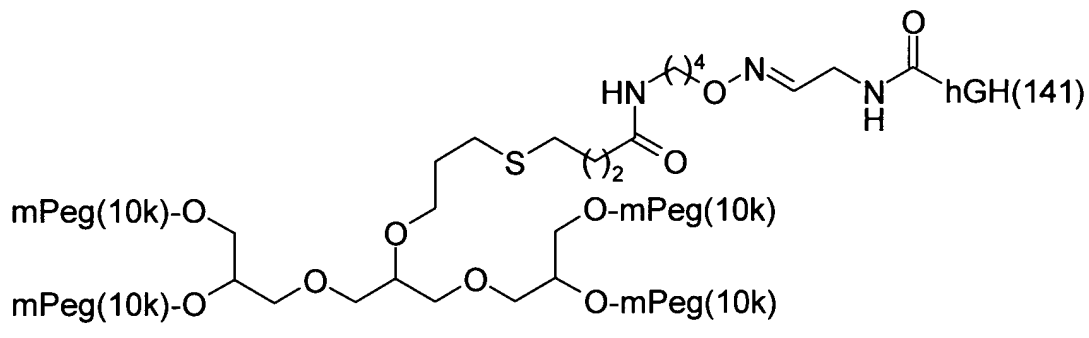
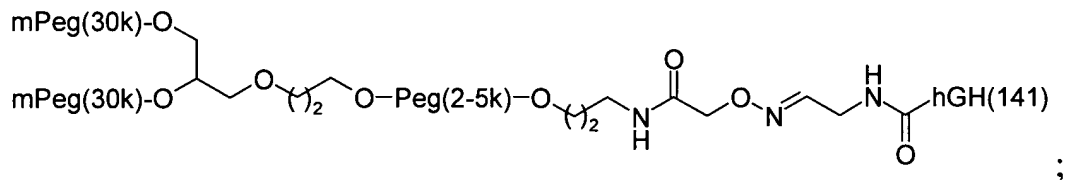
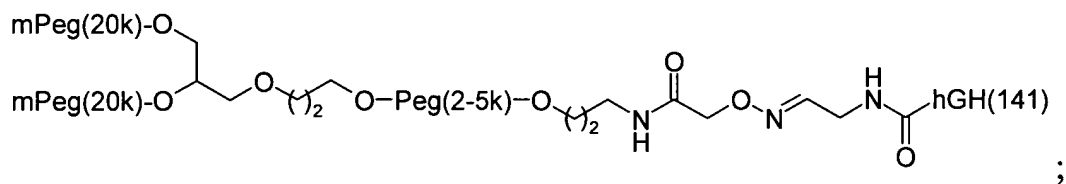
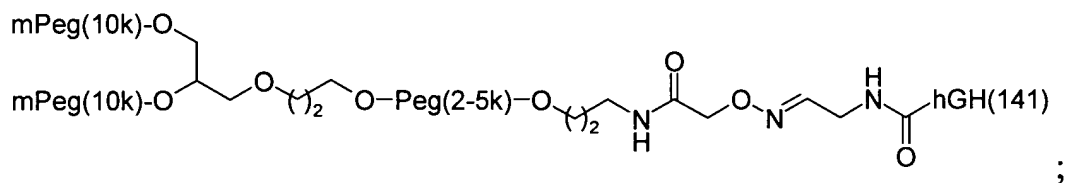
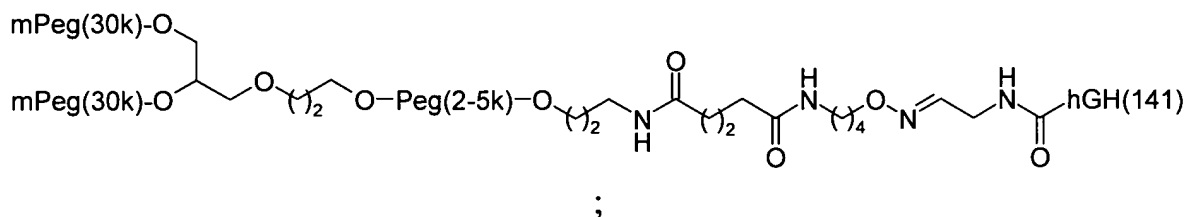
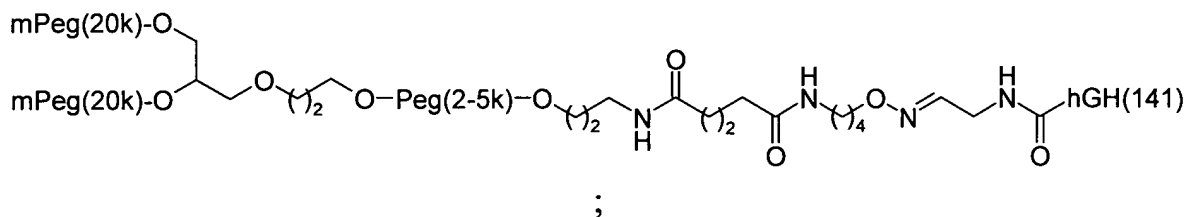
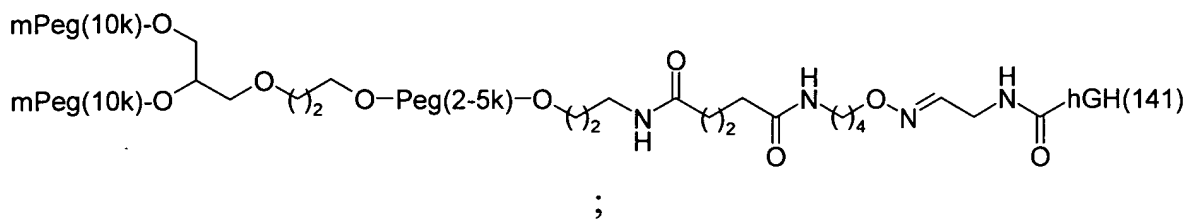


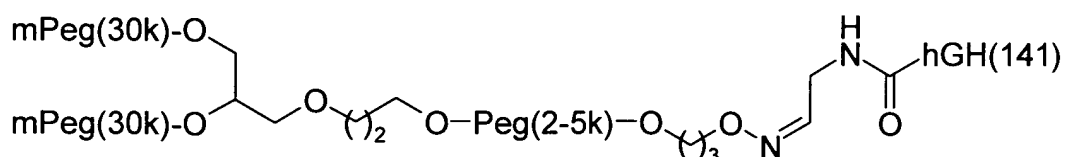
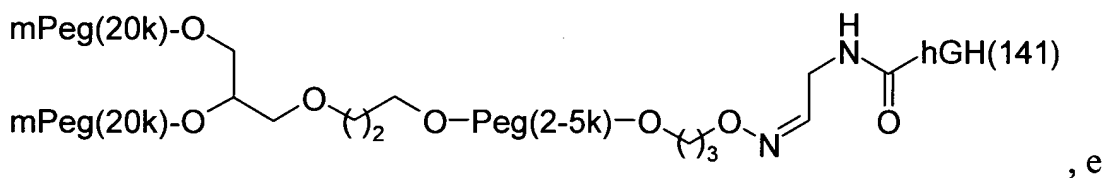
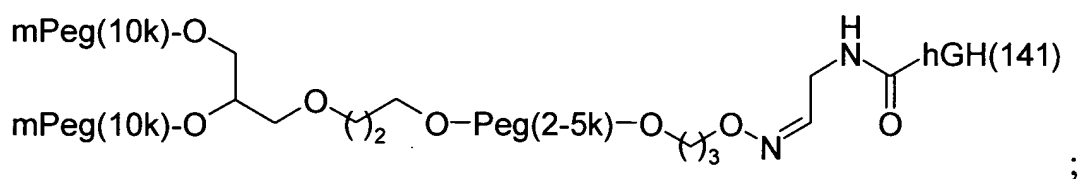
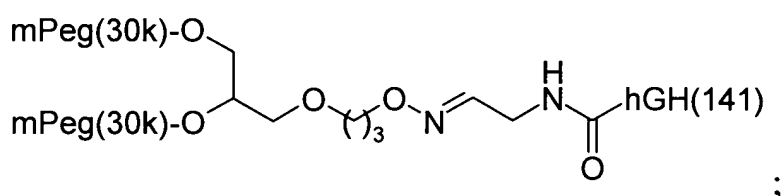
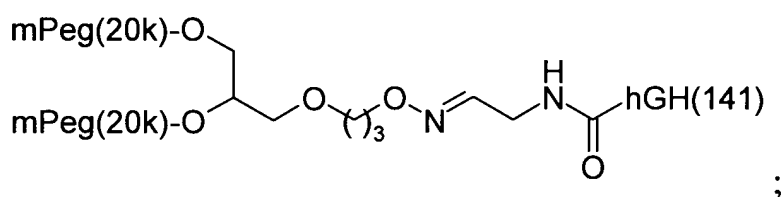
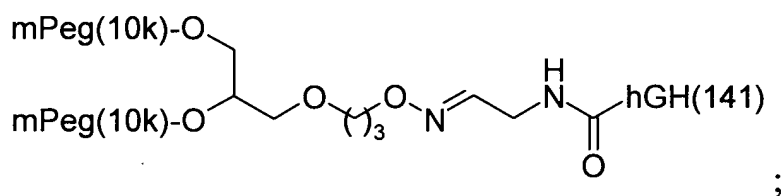
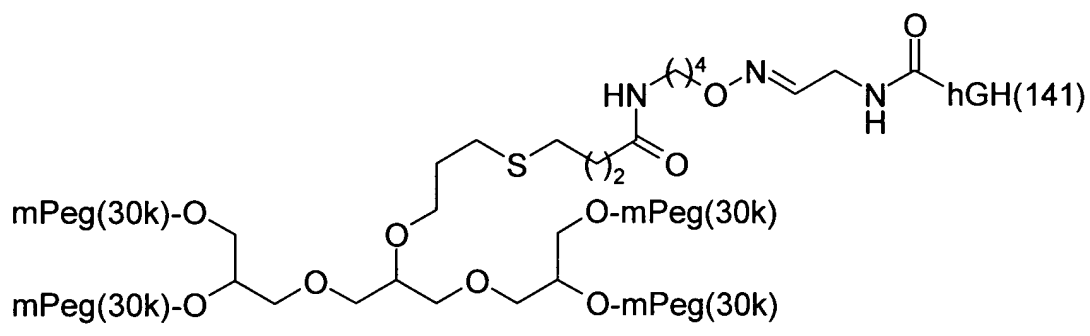
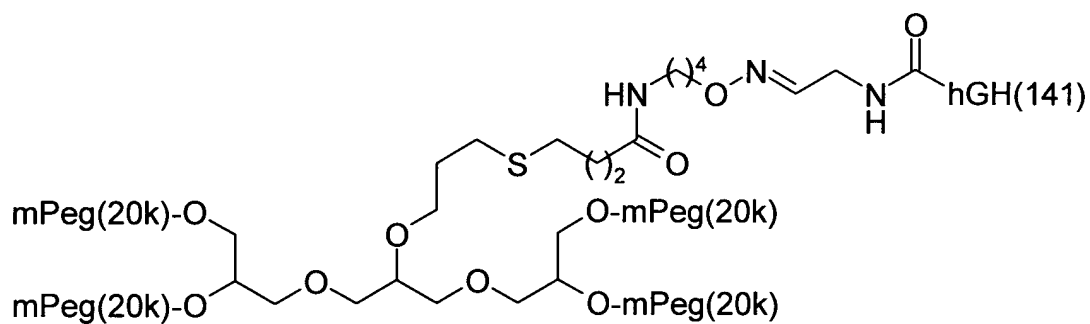
;





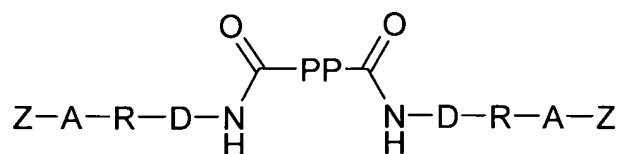






Forma de realização 36. Composto de acordo com a fórmula

[VI]



[VI]

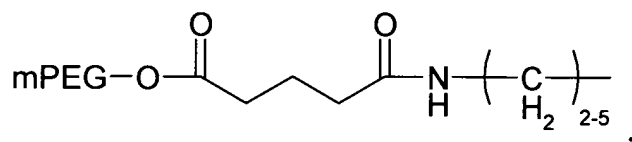
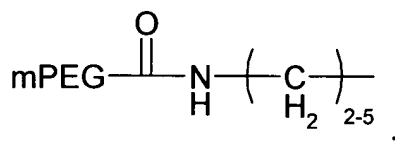
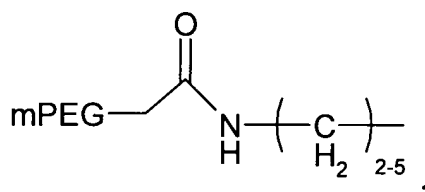
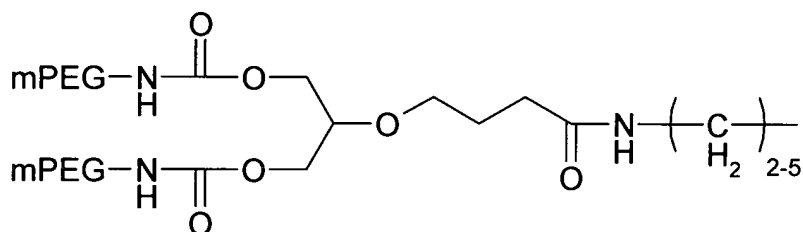
em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em referido polipeptídeo;

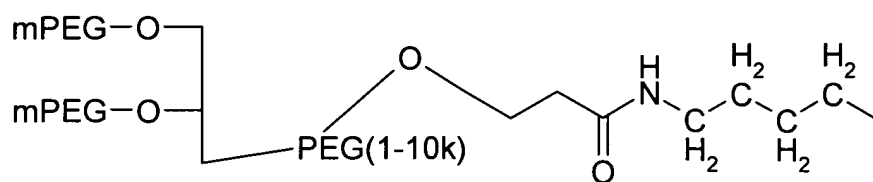
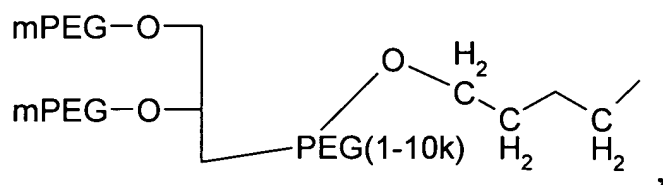
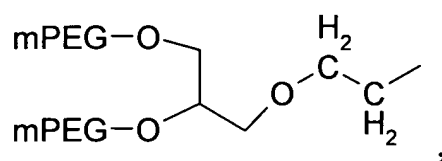
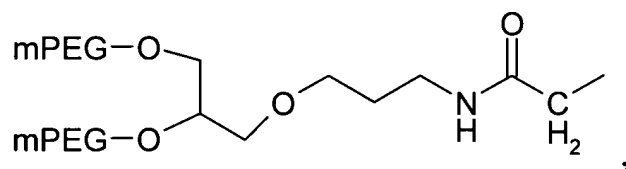
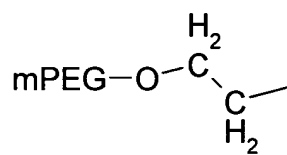
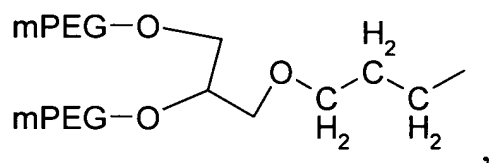
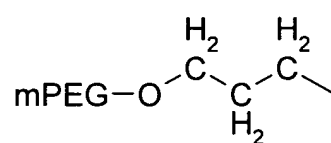
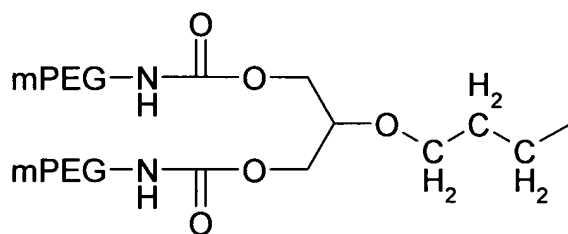
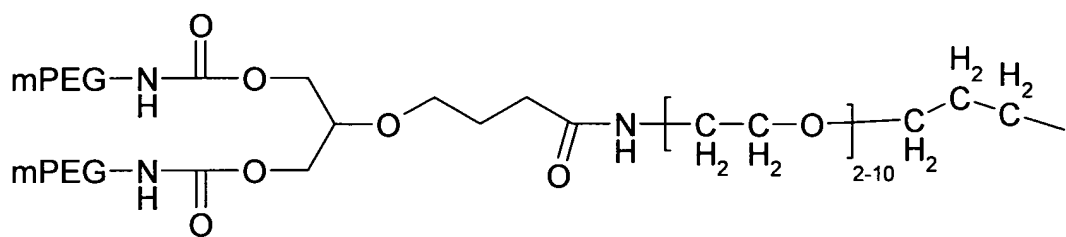
D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação;

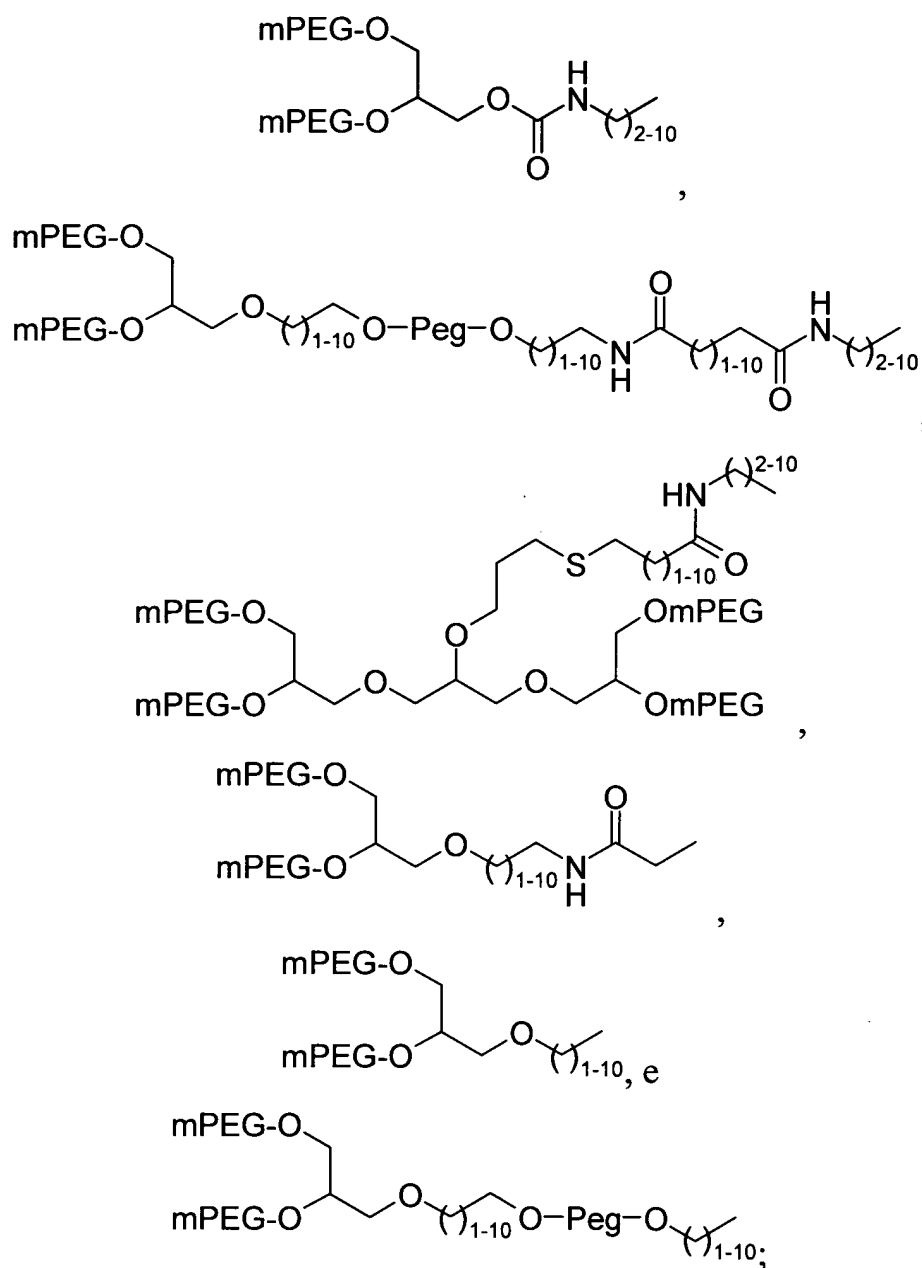
R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, ou C_{5-15} heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

Z representa uma porção selecionada dentre



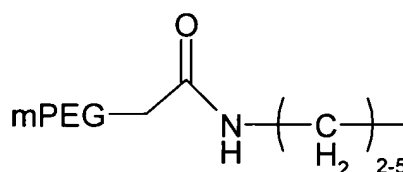




em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

e sais, pró-drogas ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis do

5 mesmo;



desde que se Z é $(\text{---})_{2-5}$, então mPEG é 10 kDa mPEG.

Forma de realização 37. Composto de acordo com a forma de realização 36, em que D representa -O-.

Forma de realização 38. Composto de acordo com a forma de realização 36, em que D representa uma ligação única.

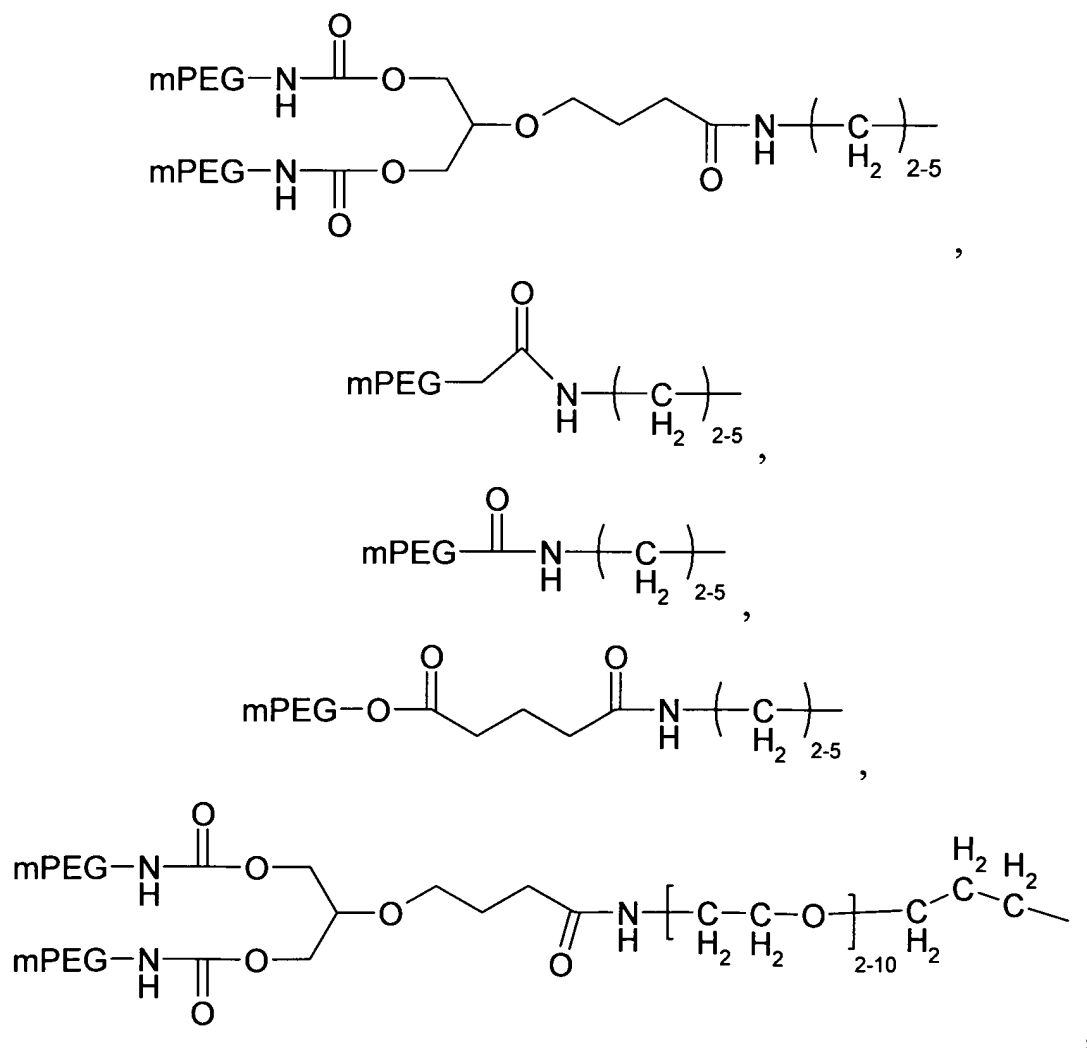
Forma de realização 39. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 36 a 38, em que R representa $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ou $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$.

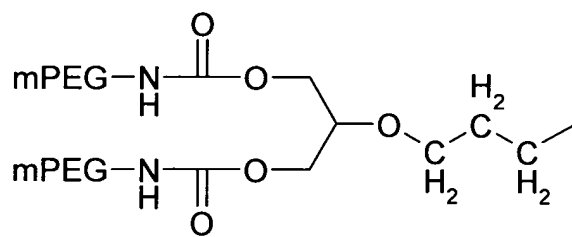
Forma de realização 40. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 36 a 38, em que R representa C_{1-6} alquilenos.

Forma de realização 41. Composto de acordo com a forma de realização 40, em que R representa C_{1-3} alquilenos.

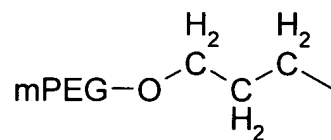
Forma de realização 42. Composto de acordo com a forma de realização 41, em que R representa metileno ou propileno.

Forma de realização 43. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 36 a 42, em que Z representa

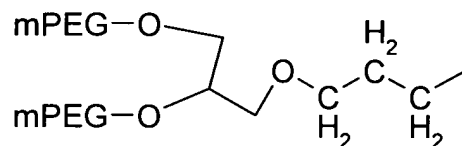




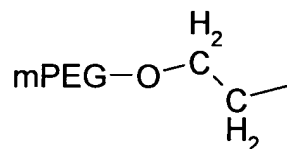
,



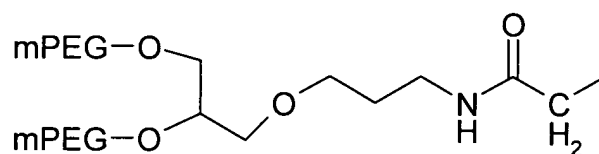
,



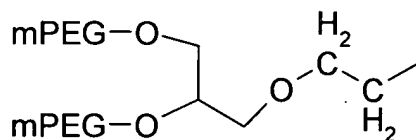
,



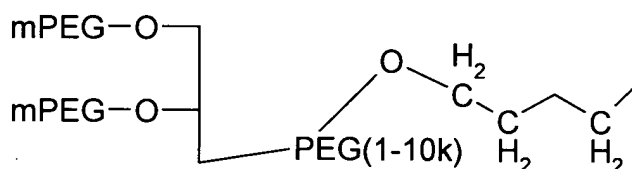
,



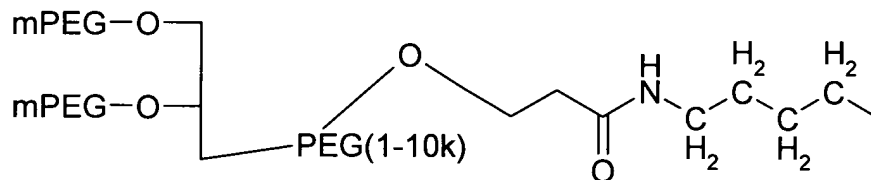
,



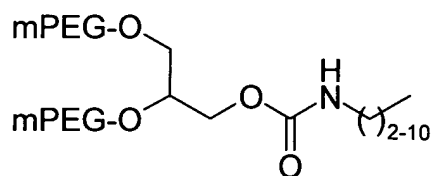
,



,



,



,

desde que se Z é

$$\text{mPEG}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{2-5}$$

, então PEG é 10 kDa PEG.

10

Forma de realização 45. Composto de acordo com a forma de

realização 44, em que GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em um hGH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

5 Forma de realização 46. Composto de acordo com a forma de realização 44, em que GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em 20 kDa hGH.

Forma de realização 47. Composto de acordo com a forma de realização 44, em que

10 GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e da cadeia lateral do resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1;

ou

15 GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um
20 outro resíduo de glutamina presente em uma posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

ou

25 GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um outro resíduo de glutamina presente em uma posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de duas glutaminas presentes em um hGH em posições diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1, em que qualquer resíduo de glutaminas presentes nas posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outros aminoácidos.

Forma de realização 48. Hormônio de crescimento humano, que é covalentemente fixado a uma porção compreendendo PEG, e em particular mPEG, em que referido porção compreendendo PEG é fixada na cadeia lateral de resíduo de glutamina 40, na cadeia lateral de glutamina 141 ou nas cadeias laterais de glutamina 40 e glutamina 141 de hormônio de crescimento humano, desde que não seja

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(4-(4-(mPEG(20k)ilbutanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(1-(hexadecanoil)piperidin-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(2,6-bis(mPEG(20k)iloxicarbonilamino)hexanoilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(mPEG(30k)iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(mPEG(20k)iloxi)butirilamino)

butiloxiimino)etil) hGH, ou

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(3-(mPEG(30k)iloxi)propanoilamino)butiloxiimino)etil) hGH.

Forma de realização 49. Composto obtido por uso de um método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 22.

Forma de realização 50. Composto caracterizado pelo fato de ser obtível pelo uso de um método de acordo com qualquer uma das formas de realização 1 a 22.

5 Forma de realização 51. Composto obtido por uso de um método de acordo com qualquer uma das formas de realização 19 a 22.

Forma de realização 52. Composto caracterizado pelo fato de ser obtível pelo uso de um método de acordo com qualquer uma das formas de realização 19 a 22.

10 Forma de realização 53. Composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 31 a 35, qualquer uma das formas de realização 44 a 52, forma de realização 51, ou forma de realização 52 para uso em terapia.

15 Forma de realização 54. Composições farmacêuticas compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 31 a 35, qualquer uma das formas de realização 44 a 52, forma de realização 51, ou forma de realização 52.

20 Forma de realização 55. Um método para tratamento de deficiência de hormônio de crescimento (GHD); Síndrome de Turner; Síndrome de Prader-Willi (PWS); Síndrome de Noonan; Síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatóide juvenil; fibrose cística, infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas que cresceram baixas na idade gestacional (SGA); estatura baixa em crianças que nasceram com peso muito baixo (VLBW) mas SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa
25 idiopática (ISS); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tal como tíbia, fíbula, fêmur, úmero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso, e dígito; fraturas em ou de ossos espongiósos, tal como o remo, base de mão, e base do pé; pacientes após cirurgia dos tendões ou ligamentos em por exemplo mão, joelho, ou ombro; pacientes tendo ou passando através de

oteogenese de distração; pacientes após substituição de bacia ou disco, reparo do menisco, fusões da espinha ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, ombro, pulso ou maxilar; pacientes em que o material de osteosíntese, tal como pregos, parafusos e placas, foram fixados; pacientes
 5 com falta de união ou má união de fraturas; pacientes após osteatomia, por exemplo da tíbia ou do primeiro dedo; pacientes após implante de enxertos; degeneração de cartilagem articular em joelho causado por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular
 10 associada com má nutrição APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idosos com APCD; doença crônica do fígado APCD, síndrome de fadiga em APCD; doença de Crohn; função de fígado prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome de intestino curto; obesidade central; síndrome de
 15 lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva principal, destoxificação de álcool/drogas ou trauma neurológico; envelhecimento; idosos frágeis; osteo-artrite; cartilagem traumáticamente danificada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; dano traumático ao cérebro; hemorragia subaracnóide;
 20 peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças; para aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; aceleração ou melhora do fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido danificado, o método
 25 compreendendo administração a um paciente em necessidade da mesma de uma quantidade eficaz de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 31 a 35, qualquer uma das formas de realização 44 a 52, forma de realização 51, ou forma de realização 52 ou as composições farmacêuticas de acordo com a

forma de realização 54.

Forma de realização 56. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das formas de realização 31 a 35, qualquer uma das formas de realização 44 a 52, forma de realização 51, ou forma de realização 52 na

5 fabricação de um medicamento a ser usado no tratamento de deficiência de hormônio de crescimento (GHD); Síndrome de Turner; Síndrome de Prader-Willi (PWS); Síndrome de Noonan; Síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatóide juvenil; fibrose cística, infecção por HIV em

10 crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas que cresceram baixas na idade gestacional (SGA); estatura baixa em crianças que nasceram com peso muito baixo (VLBW) mas SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tal como tíbia, fíbula, fêmur, úmero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso, e dígito; fraturas

15 em ou de ossos espongiósos, tal como o rádio, base de mão, e base do pé; pacientes após cirurgia dos tendões ou ligamentos em por exemplo mão, joelho, ou ombro; pacientes tendo ou passando através de osteogênese de distração; pacientes após substituição de bacia ou disco, reparo do menisco, fusões da espinha ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro,

20 ombro, pulso ou maxilar; pacientes em que o material de osteossíntese, tal como pregos, parafusos e placas, foram fixados; pacientes com falta de união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo da tíbia ou do primeiro dedo; pacientes após implante de enxertos; degeneração de cartilagem articular em joelho causado por trauma ou artrite; osteoporose em

25 pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular associada com má nutrição APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar obstrutiva crônica em APCD; HIV em APCD; idosos com APCD; doença crônica do fígado APCD, síndrome de fadiga em APCD; doença de Crohn;

função de fígado prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome de intestino curto; obesidade central; síndrome de lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva principal, destoxificação de álcool/drogas ou trauma neurológico; 5 envelhecimento; idosos frágeis; osteo-artrite; cartilagem traumaticamente danificada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; dano traumático ao cérebro; hemorragia subaracnóide; peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças; aceleração da 10 cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; aceleração ou melhora do fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido danificado.

Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente e patentes incorporadas por referência em sua totalidade e na mesma 15 extensão como se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada para ser incorporada por referência e como especificados em sua totalidade aqui (na extensão máxima permitida pela lei), apesar de qualquer incorporação provida separadamente dos documentos particulares feitas em outras partes aqui.

20 Todos os cabeçalhos e sub-cabeçalhos são usados aqui por conveniência apenas e não devem ser construídos como limitando a invenção de alguma forma.

Qualquer combinação dos elementos acima-descritos em todas as suas variações possíveis é englobada pela invenção salvo indicado em 25 contrário aqui ou de outra foram claramente contradito pelo contexto.

O uso dos termos “um” e “uma” e “o” e referentes similares no contexto de descrição da invenção deve ser construído para cobrir tanto o singular como o plural, salvo indicado em contrário aqui ou claramente contradito por contexto. Por exemplo, a expressão "o composto" deve ser

entendida como se referindo a vários "compostos " da invenção ou aspecto particular descrito, salvo indicado em contrário.

As descrições de faixas de valores são aqui apenas pretendidas para servir como um método abreviado de referência individualmente a cada valor separado caindo dentro da faixa, salvo indicado em contrário aqui, e cada valor separado é incorporado no relatório como se fosse individualmente descrito aqui.

Salvo indicado em contrário, 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 medida pode ser considerado para também prover uma medida aproximada correspondente, modificada por "cerca de" onde apropriado).

Todos os métodos descritos aqui podem ser realizados em qualquer ordem apropriada, salvo indicado em contrário aqui ou de outra forma claramente contradito por contexto.

O uso de qualquer um e todos os exemplos, ou expressões exemplares (por exemplo, "como") provido aqui, se destina a penas a melhor esclarecer a invenção e não colocada uma limitação no escopo da invenção salvo indicado em contrário. Nenhum expressão no relatório deve ser construída como indicando que qualquer elemento é essencial para a prática da invenção salvo se for explicitamente afirmado.

A citação e incorporação de documentos de patente aqui é feita por conveniência apenas e não reflete qualquer aspecto de validade, patentabilidade e/ou vigor destes documentos de patente

A descrição aqui de qualquer aspecto ou aspecto da invenção usando termos tal como "compreendendo", "tendo", "incluindo," ou "contendo" com referência a um elemento ou elementos se destina a prover suporte para um aspecto similar ou aspecto da invenção que "consiste de", "consiste essencialmente de", ou "substancialmente compreende" que este

elemento ou elementos particulares, salvo indicado em contrário ou claramente contradito por contexto (por exemplo, a composição descrita aqui como compreendendo um elemento particular deve ser entendida como também descrevendo uma composição consistindo deste elemento, salvo
5 indicado em contrário ou claramente contradito por contexto). As propriedades básicas e novas com relação a estes aspectos da invenção são providas aqui.

Esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes dos assuntos citados nos aspectos e reivindicações apresentados aqui na extensão
10 máxima permitida pela lei aplicável.

EXEMPLOS

O TGase usado nos exemplos é transglutaminase microbiana de *Streptovercillium mobaraenae* de acordo com US5156956 ou de *Streptomyces Lydicus* de acordo com WO 9606931-A1.

15 Métodos Analíticos

Espectrometria de massa Maldi-Tof.

Os pesos moleculares foram determinados usando o instrumento Autoflex Maldi-Tof (Bruker). Amostras foram preparadas de acordo com o método sandwich. Matriz 1 foi uma solução de 10 mg ácido
20 alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico em 1 ml acetona. Matriz 2 foi uma solução de 10 mg alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico em 1 ml de acetonitrila a 50% em água. Amostras foram preparadas no reservatório por aplicação seqüencial de 1 µl de matriz 1, secagem em ar, aplicação de 1 µl 3% ácido trifluoroacético, aplicação de amostra de 1 µl, aplicação de 1 µl de matriz 2, secagem em ar,
25 lavagem da placa de alvo com água e finalmente secagem em ar. Os espectros foram adquiridos usando 20% força de laser e o método padrão para a faixa de 3- 20 kDa que foi fornecida com o instrumento.

Quantificação de proteína

As concentrações de proteína foram estimadas por medida da

absorbância a 280 nm usando espectrofotômetro de V-. Um coeficiente de extinção molar de $16170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado. Quantidades foram calculadas dos volumes e concentrações.

"SDS page"

5 A eletroforese de gel SDS poli-acrilamida foi realizada usando géis NuPAGE 4% - 12 % Bis-Tris (Invitrogen NP0321BOX). Os géis foram coloridos com prata (Invitrogen LC6100) ou coloridos com Coomassie (Invitrogen LC6065) e onde relevante também coloridos for PEG com iodeto de bário, como descrito em M. M. Kurfurst, Anal.Biochem. 200(2), 244-248
10 (1992).

Análise RP-HPLC.

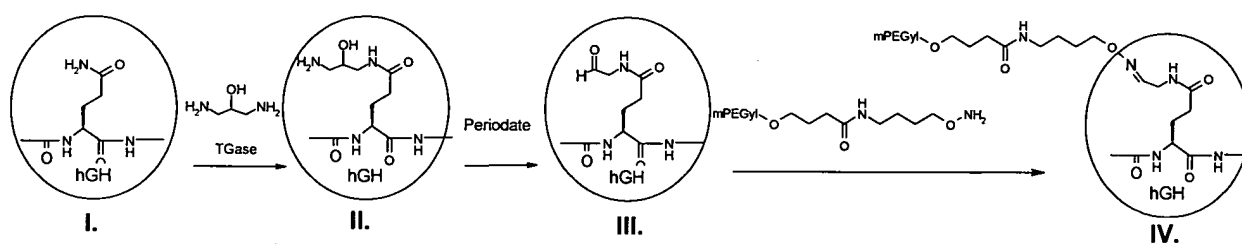
Sistema A.: sistema Merck-Hitachi consistindo de: L-7400 detector de UV, L-7200 autoamostrador e bomba L-7100. Uma coluna de sílica Zorbax SB-300 4,6mm x 50mm 5 μ m C-18 (Agilent Technologies) foi
15 usada e detecção foi por UV a 214 nm. A coluna foi equilibrada com 0,1 % ácido trifluoroacético / H₂O e eluída por um gradiente de 0 a 90% acetonitrila contra 0,1 % ácido trifluoroacético /H₂O durante 10 min a temperatura ambiente, com um fluxo de 1 ml/min.

Análise CE (eletroforese capilar) analysis:

20 A eletroforese capilar foi realizada usando um sistema Agilent Technologies 3DCE (Agilent Technologies). A aquisição de dados e processamento do sinal foram realizados usando Agilent Technologies 3DCE ChemStation. O capilar foi a 64,5cm (56,0 cm comprimento eficiente) 50 μ m i.d. "Extended Light Path Capillary" de Agilent. A detecção por UV foi
25 realizada a 200 nm (16 nm Bw,Referência 380 nm e 50 nm Bw). O eletrólito de ciclagem foi tampão fosfato 50mM pH7 (método A) ou tampão fosfato 50mM pH2,5 (método B).O capilar foi condicionado com 0,1 M NaOH durante 3min, então com água Milli-Q durante 2min e com o eletrólito durante 3min. Após cada ciclo, o capilar foi varrido com água milli-Q durante

2 min, então com ácido fosfórico durante 2 min, e com água milli-Q durante 2 min. A injeção hidrodinâmica foi feita a 50 mbar durante 4,0 s. A voltagem foi +25 kV. A temperatura do capilar foi 30 C e o tempo de ciclo foi 10,5min (método A) ou 20 min (método B).

5 Exemplos 1 e 2 são destinados a prover um exemplo ilustrativo de PEGuilação de hGH usando transaminação com um aldeído latente – ver também WO2005070468.



I. hGH, hormônio de crescimento humano

II. $N^{\epsilon 40}/N^{\epsilon 141}$ -(2-hidroxi-3-amino-propil) hGH

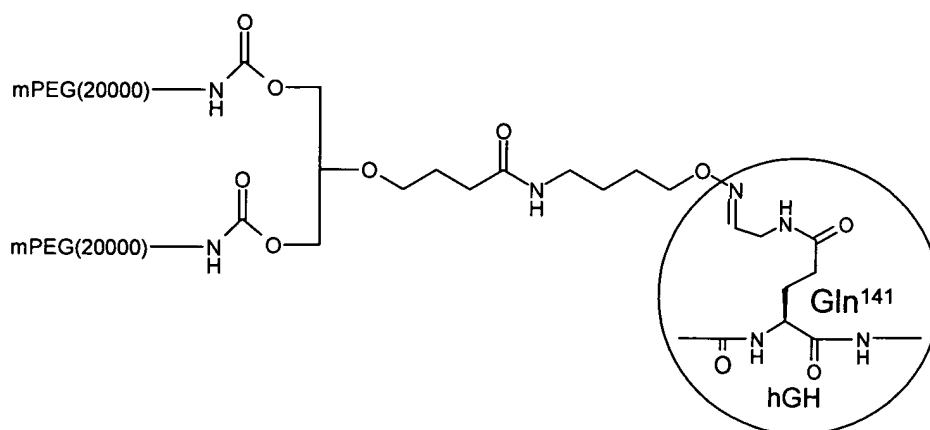
III. $N^{\epsilon 40}/N^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH

IV. $N^{\epsilon 40}/N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-

(mPEGuiloxy)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH

Exemplo 1

Preparação de $N^{\epsilon 141}$ -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH



(a) Trans-aminação de hGH (I.) para dar $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidroxi-3-aminopropil) hGH (II.)

15 hGH (I.) (200 mg) foi dissolvido em tampão fosfato (50 mM,

pH 8,0, 14 ml).

Esta solução foi misturada com uma solução de 1,3-Diaminopropan-2-ol (4 mmol, 378 mg) dissolvido em tampão fosfato (50 mM, 1 ml, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 com ácido clorídrico diluído após
5 dissolução de 1,3-Diamino-propan-2-ol).

Finalmente, uma solução de TGase (18 mg ~ 40 U) dissolvida em tampão fosfato (50 mM, pH 8,0, 1 ml) foi adicionada e o volume foi ajustado a 20 ml por adição de tampão fosfato (50 mM, pH 8,0) dando uma concentração de 1,3-Diaminopropan-2-ol a 0,2 M. A mistura combinada foi
10 incubada durante 4 horas a 37 °C.

A temperatura foi abaixada a temperatura ambiente e N-etilmaleimida foi adicionado a uma concentração final de 1 mM.

Após outra hora, a mistura foi diluída com 10 volumes de tampão tris (50 mM, pH 8,5).

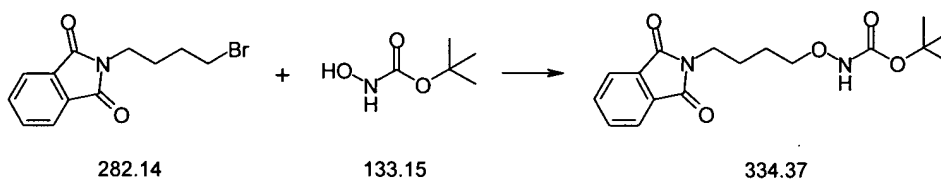
15 A análise CE da mistura resultante mostra dois picos principais correspondendo à hGH e N^{ε141}-(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) e dois picos menores, correspondendo à N^{ε40}-(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) e N^{ε40},N^{ε141} -bis(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH. Os dois últimos componentes são removidos durante a seguinte purificação, mas eles podem ter sido
20 recuperados.

(b) cromatografia de troca iônica de N^{ε141}-(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.)

A solução resultante de (a) foi aplicada a uma coluna MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17- 5167-01) pré-equilibrado com tampão A (50 mM tris, pH 8,5). Ela foi então eluída a um fluxo de 2,5
25 ml/min com um gradiente de 0% a 100% de tampão B (50 mM tris, 0,2 M NaCl, pH 8,5) em tampão A over 63 min. Frações foram coletadas com base em Absorção de UV a 280 nm e análise Maldi-Tof foi realizada em frações selecionadas. As frações correspondendo ao pico maior dando o mw esperado de acordo com a espectrometria de massa Maldi-Tof foram reunidas. Esta

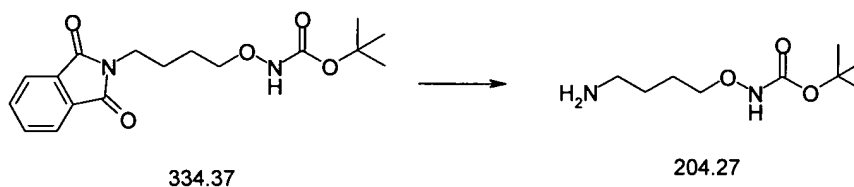
poça contém hGH (I.) e N^ε¹⁴¹-(2-hidróxi-3-amino-propil) hGH (II.) em uma relação 60:40 encontrada por CE (método A). Os experimentos de mapeamento de peptídeos descritos em pedido internacional WO2005DK000028 demonstraram previamente que os procedimentos combinados de (a) e (b) resultam em derivatização seletiva de Gln-141.

(c) Síntese de N-(4-(terc-Butiloxycarbonilaminooxi)butil)ftalimida



A uma mistura agitada de *N*-(4-bromobutil)ftalimida (18,9 g, 67,0 mmol), MeCN (14 ml), e *N*-Boc-hidroxilamina (12,7 g, 95,4 mmol) foi adicionado DBU (15,0 ml, 101 mmol) em porções. A mistura resultante foi agitada a 50 °C durante 2 4 h. Água (300 ml) e 12 M HCl (10 ml) foram adicionados, e o produto foi extraído três vezes com AcOEt. Os extratos combinados foram lavados com salmoura, secados (MgSO₄), e concentrados sob pressão reduzida. O óleo resultante (28 g) foi purificado por cromatografia (140 g SiO₂, gradiente de eluição com heptano/AcOEt). 17,9 g (80%) do composto titular foram obtidos como um óleo. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1,36 (s, 9H), 1,50 (m, 2H), 1,67 (m, 2H), 3,58 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 3,68 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 7,85 (m, 4H), 9,90 (s, 1H).

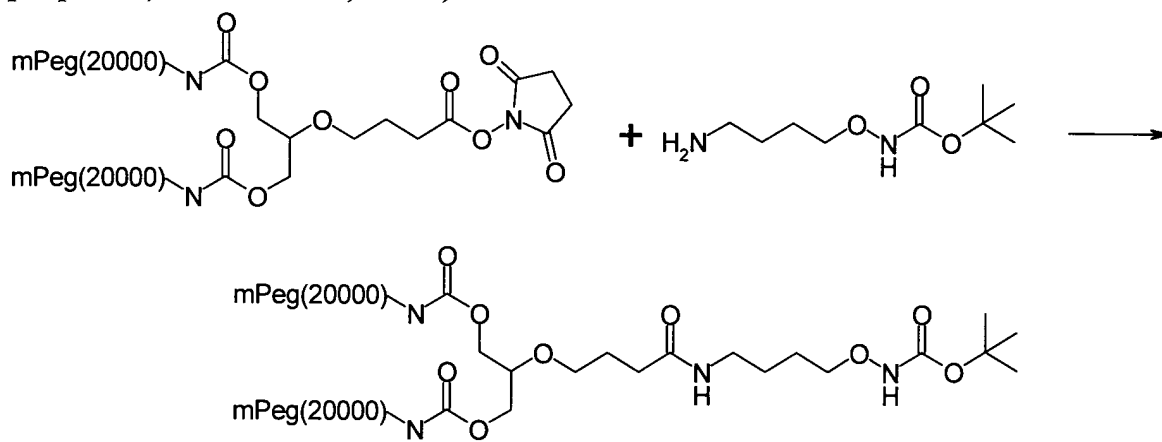
(d) Síntese de 4-(terc-Butiloxycarbonilaminooxi)butilamina.



A uma solução de *N*-(4-(terc-butiloxycarbonilaminooxi)butil)ftalimida obtida de (a) (8,35 g, 25,0 mmol) em EtOH (10 ml) foi adicionado hidrato de hidrazina (20 ml), e a mistura foi agitada a 80 °C durante 3 8 h. A mistura foi concentrada e o resíduo co-evaporado com EtOH e PhMe. Ao resíduo foi adicionado EtOH (50 ml), e a ftal-hidrazida precipitada foi filtrada

e lavada com EtOH (50 ml). Concentração dos filtrados combinados deu 5,08 g de um óleo. Este óleo foi misturado com uma solução de K_2CO_3 (10 g) em água (20 ml), e o produto foi extraído com CH_2Cl_2 . A secagem de ($MgSO_4$) e concentração deram 2,28 g (45%) do composto titular como um óleo, que foi usado sem outra purificação. 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 1,38 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,51 (m, 2H), 2,51 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,66 (t, $J = 7$ Hz, 2H).

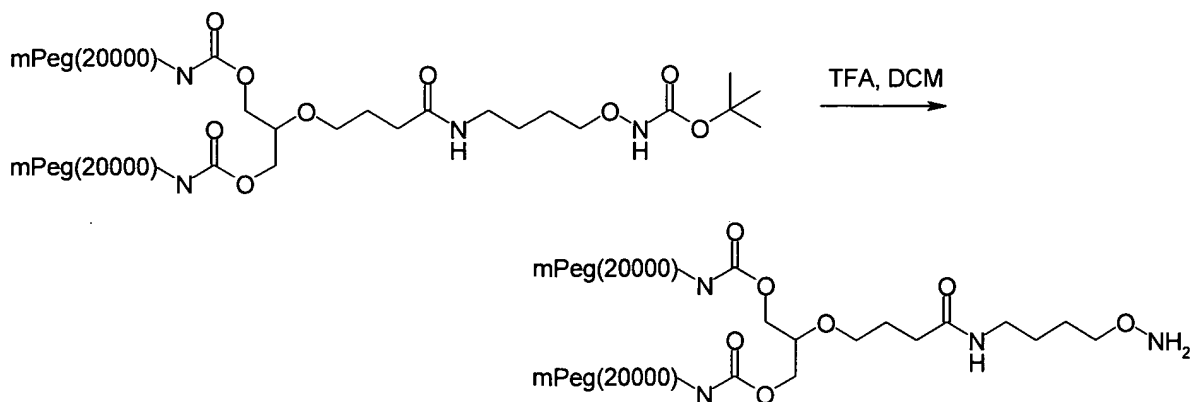
(e) Síntese de N-Boc-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)-butil)hidroxil-amina.



10 (mPeg(20000)-NH-CO-O- CH_2)₂CH-O-(CH_2)₃-CO-OSu

(Nektar, 2Z3Y0T01, 2,0 g, 50 μ mol) foi misturado com uma solução de 4-(Boc-aminoxi)butilamina (187 mg, 915 μ mol) em DCM (12 ml). Após agitar em temperatura ambiente durante 43 h, a mistura foi adicionada em gotas a Et_2O agitado (200 ml). Filtração, lavagem com Et_2O . O produto foi redissolvido em DCM (10 ml), e precipitado uma vez mais de Et_2O (200 ml). Esta precipitação foi repetida três vezes. O produto foi então dissolvido em DCM (100 ml) e tratado com Amberlyst 15 (11 g; lavado com DCM) durante 5 min. Após filtração e concentração, o produto foi precipitado de Et_2O como acima. Filtração e secagem sob pressão reduzida deram 1,98 g do composto titular como um sólido.

20 (f) Síntese de O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000) aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)-hidroxilamina



O produto de uma reação anterior (1,0 g) foi dissolvido em DCM, e Amberlyst 15 (8,0 g; lavado com DCM) foi adicionado. Após agitar durante 10 min, a mistura foi filtrada e o filtrado concentrado. Ao resíduo foram adicionados DCM (25 ml) e TFA (25 ml). Após permanecer em temperatura ambiente durante 0,5 h, a mistura foi concentrada, o resíduo coevaporado duas vezes com uma mistura de DCM e tolueno, e secado sob pressão reduzida durante a noite. O resíduo foi dissolvido em água (15 ml) e lavado duas vezes com água usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). A solução foi então neutralizada por adição de 2-metilpiridina a pH 6. Esta solução foi usada diretamente para a oximação.

(g) Oxidação de $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) para dar $N^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (III.)

O tampão das frações reunidas de (b) 2 contendo 53,8 mg de (I.) e (II.) foi trocado quatro vezes a tampão 15 mM trietanolamina/ 137mM 3-(Metiltio)-1-propanol pH 8,5 (ajustado com ácido clorídrico 1 N) usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). Então, a solução foi concentrada a 5,4 ml. A esta foi adicionado 0,54 ml de um periodato de sódio a 25 mM em solução de água, e a mistura foi incubada durante 30 min a temperatura ambiente no escuro.

A solução foi então lavada três vezes com tampão trietanolamina 15 mM pH 8,5 usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). Ela foi então resfriada em gelo 1,62 ml e N,N-dimetilformamida resfriada em gelo foi adicionada.

(h) Oximação de $N^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (III.) com O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)oxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)hidroxilamina para dar $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)oxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH

5 A mistura resultante de (g) foi lentamente adicionada a uma solução de PEG de (f) sob misturação suave e a reação foi deixada prosseguir em temperatura ambiente durante 72 h.

(i) Cromatografia de troca iônica de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)oxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH.

10 A solução resultante de (h) foi aplicada a uma coluna MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17- 5167-01) pré-equilibrada com tampão A (10 mM tris, pH 8,0).

Ela foi então eluída a um fluxo de 2,0 ml/min com um gradiente de 0% a 100% de tampão B (10 mM tris, 0,2 M NaCl, pH 8,0) em
15 tampão A durante 79 min. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm. As frações foram reunidas correspondendo ao pico desejado e concentradas a 10 ml em um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore).

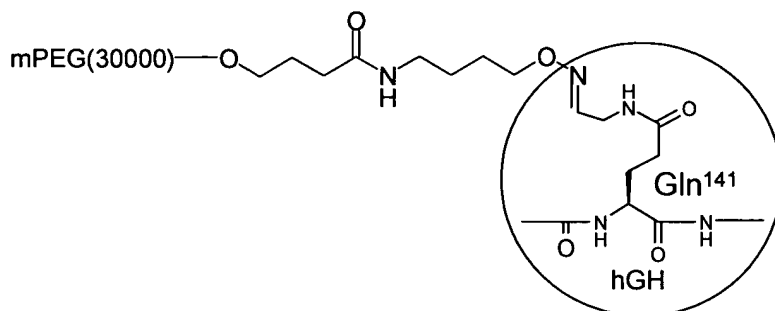
(j) Cromatografia de exclusão de tamanho de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20000)oxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH
20

A solução concentrada resultante de (i) foi aplicada a uma coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 (Amersham Biosciences cat. No. 17-1071-01) pré-equilibrada com tampão C (50mM hidrogeno-carbonato de amônio, pH 8,0). Ela foi então eluída a um fluxo de 0,5 ml/min tampão C
25 durante 956 min. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm, e reunidas de acordo com os testes anteriores.

SDS page mostrou uma banda única com um peso molecular aparente maior do que 120 kDa.

Exemplo 2

Preparação de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)butirilamino)-butil)oxiimino)-etil] hGH



(a) Trans-aminação de hGH (I.) para dar $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.)

hGH (I.) (200 mg) foi dissolvido em tampão fosfato (50 mM, pH 8,0, 14 ml).

5 Esta solução foi misturada com uma solução de 1,3-Diaminopropan-2-ol (378 mg) dissolvido em tampão fosfato (50 mM, 0,5 ml, pH 8,0, pH ajustado a 8,0 com ácido clorídrico diluído após dissolução de 1,3-Diamino-propan-2-ol).

10 Finalmente, uma solução de TGase (18 mg ~ 40 U) dissolvido em tampão fosfato (50 mM, pH 8,0, 0,5 ml) foi adicionado e o volume foi ajustado a 20 ml por adição de tampão fosfato (50 mM, pH 8,0) dando uma concentração de 1,3-Diamino-propan-2-ol a 0,2 M. o combinada mistura foi incubada durante 4 horas a 37 °C.

15 A temperatura foi abaixada a temperatura ambiente e N-etil-maleimida foi adicionada a uma concentração final de 1 mM.

20 Após outra hora, a mistura foi diluída com 10 volumes de tampão tris (50 mM, pH 8,5). Análise CE da mistura resultante mostra dois picos principais correspondendo à hGH e $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) e dois picos menores correspondendo à $N^{\epsilon 40}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) e $N^{\epsilon 40}, N^{\epsilon 141}$ -bis(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH. Os dois últimos componentes são removidos durante a purificação seguinte, mas eles podem ter sido recuperados.

(b) Cromatografia de troca iônica de N^{ε141}-(2-hidróxi-3-amino-propil) hGH (II.)

A solução resultante de (a). foi aplicada a uma coluna MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17- 5167-01) pré-equilibrada com tampão A (50 mM tris, pH 8,5). Ela foi então eluída a um fluxo de 2 ml/min com um gradiente de etapas:

Etapa 1: 0% a 60% tampão B (50 mM tris, 0,2 M NaCl, pH 8,5) em tampão A durante 12 min.

Etapa 2: 60% a 64% tampão B em tampão A durante 8 min.

Etapa 3: 64% tampão B em tampão A durante 16 min.

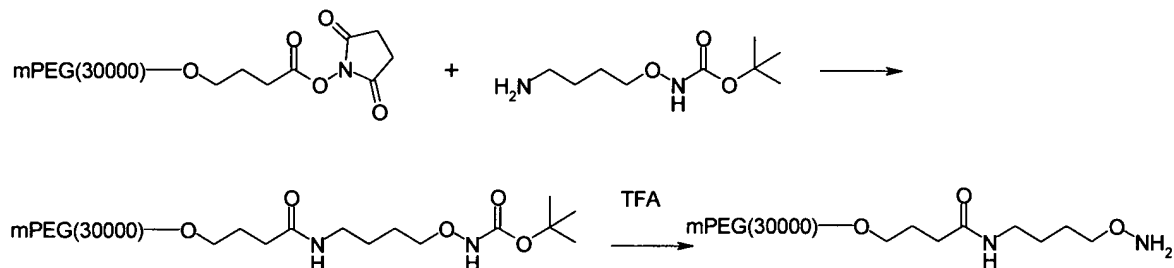
Etapa 4: 64% a 67% tampão B em tampão A durante 16 min.

Etapa 5: 67% tampão B em tampão A durante 16 min.

Etapa 6: 67% a 100% tampão B em tampão A durante 12 min.

Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm e frações correspondendo ao pico maior foram reunidas. Esta poça contém hGH (I.) e N^{ε141}-(2-hidróxi-3-amino-propil) hGH (II.) em uma relação de 58:42 encontrada por CE (método A). As experiências de mapeamento de peptídeos descritas no pedido internacional WO2005DK000028 demonstraram previamente que os procedimentos combinados de (a) e (b) resultam em derivatização seletiva de um Gln-141.

(c) Síntese de O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)butirilamino)butil)hidroxilamina



A uma solução de 4-(N-Boc-aminoxil)butilamina (0,43 g, 2,10 mmol) em DCM (40 ml) foi adicionado mPeg(30000)-O-(CH₂)₃-CO-OSu (Nektar, 2M450R01, MW 30 kDa, 5,0 g, 0,17 mmol). A mistura resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 5 d, concentrada sob pressão

reduzida, e o resíduo foi secado em vácuo. A recristalização de iPrOH (4 x 80 ml) seguida por coevaporação com DCM e secagem sob pressão reduzida deram 4,14 g da alcoxilamina Boc-protégida.

O produto da reação anterior (0,65 g) foi dissolvido em 20ml DCM, e Amberlyst 15 (6,0 g; lavado com DCM) foi adicionado. Após agitar durante 10 min, a mistura foi filtrada e o filtrado concentrado. Ao resíduo foram adicionados DCM (20 ml) e TFA (20 ml). Após permanecer a temperatura ambiente durante 0,5 h, a mistura foi concentrada, o resíduo coevaporado duas vezes com uma mistura de DCM e tolueno, e secado sob pressão reduzida durante a noite. o resíduo foi dissolvido em água (15 ml) e lavado duas vezes com água usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). A solução foi então neutralizada por adição de 2-metilpiridina a pH 6. Esta solução foi usada diretamente para a oximação.

(d) Oxidação de $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II.) para dar $N^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (III.)

O tampão das frações reunidas de (b) contendo 78,14 mg de (I.) e (II.) foi trocado quatro vezes com um tampão 15 mM trietanolamina/137mM 3-(Metiltio)-1-propanol pH 8,5 (ajustado com 1 N ácido clorídrico) usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). Finalmente, a solução foi concentrada a 3,3 ml. A isto foi adicionado 0,33 ml de um periodato de sódio 25 mM em água foram adicionados, e a mistura foi incubada durante 30 min a temperatura ambiente no escuro.

A solução foi então lavada três vezes com tampão 15 mM trietanolamina pH 8,5 usando um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore). Então ela foi resfriada em gelo e 1,0 ml N,N-dimetilformamida resfriada em gelo foi adicionado.

(e) Oximação de $N^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (III.) com O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)butirilamino)butil)-hidroxilamina para dar $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH.

A mistura resultante de (d) foi lentamente adicionada à solução PEG de (c) sob misturação suave e a reação foi deixada prosseguir a temperatura ambiente durante 144 h.

- (f) Cromatografia de troca iônica de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)-butirilamino)butil)oxiimino)-etil] hGH.

A solução resultante de (e) foi aplicada a uma coluna MonoQ 10/100 GL (Amersham Biosciences cat. No. 17- 5167-01) pré-equilibrada com tampão A (10 mM tris, pH 8,0). Ela foi então eluída a um fluxo de 1,5 ml/min com um gradiente de 0% a 100% de tampão B (10 mM tris, 0,2 M NaCl, pH 8,0) em tampão A durante 107 min. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm. As frações foram reunidas correspondendo ao pico desejado e concentradas a 10 ml em um dispositivo de ultrafiltração amicon Ultra-15 (Millipore).

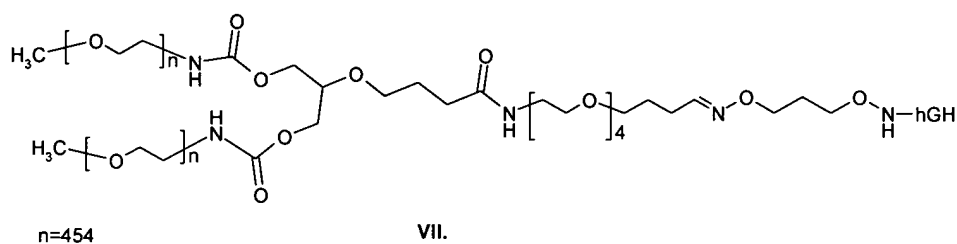
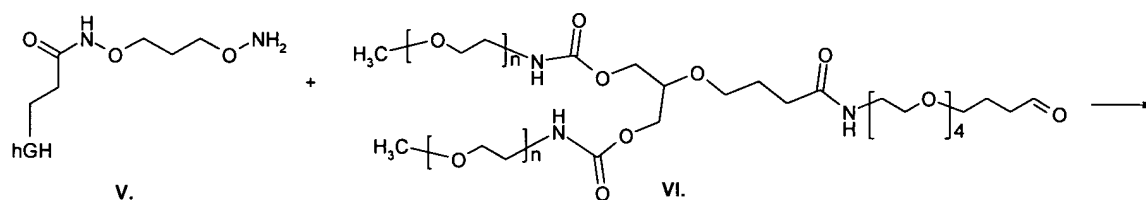
- (g) Cromatografia de exclusão de tamanho de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30000)oxi)butirilamino)-butil)oxiimino)-etil] hGH.

A solução concentrada resultante de (f) foi aplicada a uma coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 (Amersham Biosciences cat. No. 17-1071-01) pré-equilibrada com tampão C (50 mM hidrogeno-carbonato de amônio, pH 8,0). Ela foi então eluída a um fluxo de 0,5 ml/min tampão C durante 956 min. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm, e reunidas de acordo com os testes anteriores.

SDS page mostrou uma banda única com um peso molecular de app. 117 kDa.

Exemplo 3

- 25 Preparação de $N^{\epsilon 141}$ -(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPeg(20000)ilamino carboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno) aminoxi)propiloxi) hGH (VII.)



As seguintes soluções foram preparadas:

2) 2,00 g 1,3-bisaminoxipropano.2HCl (A. Shirayev, P. K.

Thoo lin, e I. K. Moiseev, Síntese, 38-40 (1997) foi dissolvido em tampão Na-
10 fosfato (50 mM, pH 6,0) cerca de 5 ml, seguido por ajuste de pH e volume
como para 1.

3) 30 mg Transglutaminase ativa WM (Ajinomoto, enzima 0,3 mg) foi dissolvida em tampão Na- fosfato (50 mM, pH 6,0) cerca de 9 ml, seguido por ajuste de pH e volume como para 1.

Soluções 1 + 2 + 3 foram misturadas, filtradas através de filtro de 0,45 µm e deixadas reagir a 22 °C durante um período de 2,5 h. Neste ponto, CE (método B) e espectroscopia de Maldi-tof mostraram aproximadamente 50% conversão de hGH, com aproximadamente 70 % dos produtos sendo o derivado de hGH desejado. (V). À mistura de reação foram adicionados 30 ml de 2 mM N-etilmaleimida aquosa (NEM). pH foi ajustado a 8,0 e a solução foi mudada com tampão 6 vezes por filtros de corte de ultrafiltração (Amicon Ultra 15 (Millipore) de 10000 Da, 3600 RCF, temperatura ambiente, reduzindo o volume a 1/10) usando uma mistura de 1:1 mistura de NEM aquoso 2 mM e tampão fosfato 50 mM, pH 8,0.

(b) Oximação de N^{ε141}-(3-(aminoxi)propoxi)hGH (V.) com 4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPeg(20000)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi) butirilamino)etoxi)-etoxi)etoxi)etoxi)butanal (VI.) para dar N^{ε141}-(3-((4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPeg(20000)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno)aminoxi)propiloxi) hGH (VII.)

Após a última lavagem em (a), pH foi ajustado a 6,0. 180 mg mPEG2-ButyrALD-40K (VI., Nektar 083Y0T01) em 10 ml de tampão foram adicionados. Reação foi completa em 3 h. RP-HPLC (sistema A) e SDS-page mostraram aproximadamente 100% de conversão do derivado de hGH- V ao hGH PEGuilado (VII.). O tampão de reação mudou 3 vezes com 10 mM tampão TRIS pH 8,5 por ultrafiltração como descrito acima.

(c) Cromatografia de troca iônica de N^{ε141}-(3-((4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPeg(20000)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno)aminoxi)propiloxi) hGH (VII.)

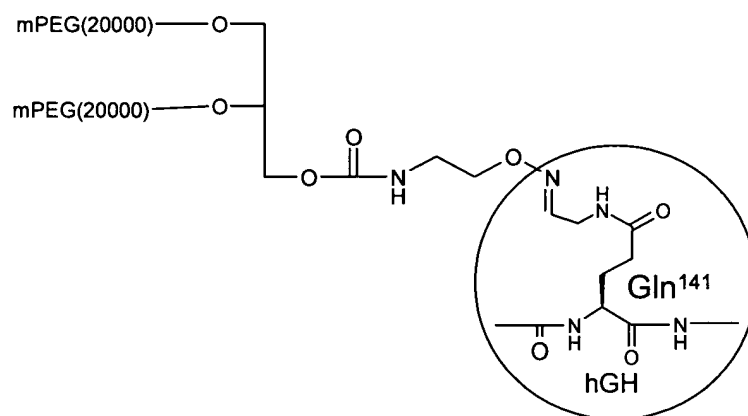
O produto bruto foi purificado em uma coluna de troca aniônica MonoQ 10/100 (Amersham Biosciences) usando 10 mM TRIS pH

8,5 (tampão A) e 10 mM TRIS pH 8,5 + 200 mM NaCl (tampão B) tampões de partida e de eluição, respectivamente. Eluição foi realizada a 2,0 ml/min com um gradiente de 0 a 100 % B durante um período de 80 min. O produto (VII.) eluiu em aproximadamente 24 % de tampão B. Frações contendo o produto desejado (VII.) foram coletadas, reunidas e mudadas em tampão 6 vezes com tampão 50 mM NH_4HCO_3 pH 8,0, e finalmente secadas por pulverização.

O produto puro (VII.) foi obtido junto com dois sub-produtos: aproximadamente 20 % de um isômero, hGH PEGuilado em posição Gln-40, e aproximadamente 10 % de um dímero, hGH PEGuilado em ambas as posições Gln-40 e Gln-141. Estes produtos foram separáveis por cromatografia de troca aniônica. A identidade dos produtos foi estabelecida por experiências de mapeamento de peptídeos e SDS-page.

Exemplo 4

15 Preparação de $\text{N}^{\epsilon 141}$ -[2-(2-(2,3-bis(mPeg(20000)iloxi)propiloxicarbonilamino)etiloximino)etil] hGH



(a), (b) $\text{N}^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH

$\text{N}^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (252 mg) foi preparado como descrito em Exemplo 1.

20 (c) Oximação de $\text{N}^{\epsilon 141}$ -(2-oxoetil) hGH (III.) com O-(2-(2,3-(mPeg(20000)iloxi)propiloxicarbonilamino)etil)hidroxilamina (Sunbright GL2-400 CA, NOF Corp., Tokyo, Japan) para dar $\text{N}^{\epsilon 141}$ -[2-(2-(2,3-

(mPeg(20000)iloxi)propiloxycarbonilamino)etiloximino)etil] hGH.

O derivado aminoxi-PEG (452 mg Sunbright GL2-400 CA, NOF Corp.) foi dissolvido em 5,5 ml de tampão de ácido (2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), 0,3 M, pH 6,5). Então a poça concentrada da oxidação foi diluída com 1,25 ml de NMP resfriado com gelo e lentamente adicionada à solução do reagente PEG. A mistura foi agitada lentamente durante 2 dias.

(d) Cromatografia de troca iônica de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(2-(2,3-(mPeg(20000)iloxi)propiloxycarbonilamino)etiloximino)etil] hGH.

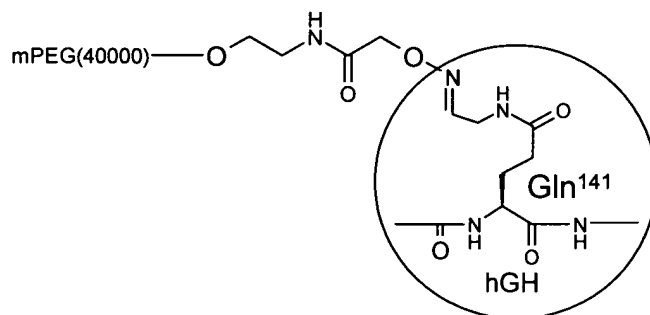
A mistura de reação de (c) foi trocada em tampão em tampão 20 mM trietanolamina pH 8,5 usando uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01) e a proteína aplicada a uma coluna de troca iônica (HiLoad 26/10 Q Sepharose HP, Amersham Biosciences) pré-equilibrada com tampão A (20 mM trietanolamina, pH 8,5). Ela foi então eluída a um fluxo de 5 ml/min com um gradiente de 0% a 100% de tampão B (20 mM trietanolamina, 0,2 M NaCl, pH 8,5) em tampão A sobre volumes de 10 colunas. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm. As frações correspondendo ao pico desejado foram reunidas.

(e) Cromatografia de exclusão de tamanho de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(2-(2,3-(mPeg(20000)iloxi)propiloxycarbonilamino)etiloximino)etil] hGH.

A poça de (d) foi concentrada a 15 ml por ultrafiltração e proteína trocada em tampão a 50 mM hidrogeno-carbonato de amônio, pH 8,0 usando uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01). A proteína foi então aplicada a uma coluna de exclusão de tamanho (HiLoad 26/10 Superdex 200, Amersham Biosciences cat. No. 17-1071-01) pré-equilibrada com 50mM hidrogeno-carbonato de amônio, pH 8,0). Ela foi então eluída a um fluxo de 1,0 ml/min. Frações foram coletadas com base em absorção de UV a 280 nm.

Exemplo 5

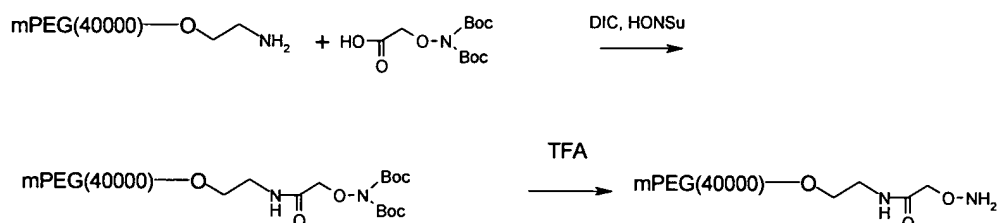
Preparação de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40000)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)oximino)etil] hGH



(a) Transaminação.

5 hGH (I) (100mg) foi transaminado com 1,3-diaminopropan-2-ol e o produto foi purificado usando procedimentos similares aos do exemplo 1 (a) e (b). De acordo com a espectrofotometria de UV e análise CE, a poça resultante de purificação continha 30 mg de proteína, onde 20 mg deram $N^{\epsilon 141}$ -(2-hidróxi-3-aminopropil) hGH (II)

10 (b) Síntese de O-(2-(2-(mPEG(40000k)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)hidroxilamina



A uma solução de ácido Bis-Boc-aminooxiacético (0,30 mg, 0,1 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionadas diisopropiletilamina (0,034 ml, 0,2 mmol), N-hidroxisuccinimida (10 mg, 0,1 mmol) e diisopropilcarbodiimida (0,016 ml, 0,1 mmol). A mistura foi agitada durante 15 min e mPeg(40000)-O-(CH₂)₂-NH₂ (Produto 008-028, Chirotech Ltd. Cambridge UK, MW 40 kDa, 1,0 g, 0,025 mmol) dissolvido em uma quantidade mínima de DCM foi adicionado. A mistura resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 6 h e o produto foi precipitado e lavado com éter dietílico. O precipitado foi redissolvido em uma mistura de 0,5 ml DMF e

1 ml DCM e precipitado e lavado com éter dietílico. Isto foi repetido uma vez mais e após secagem 770 mg de precipitado foram isolados.

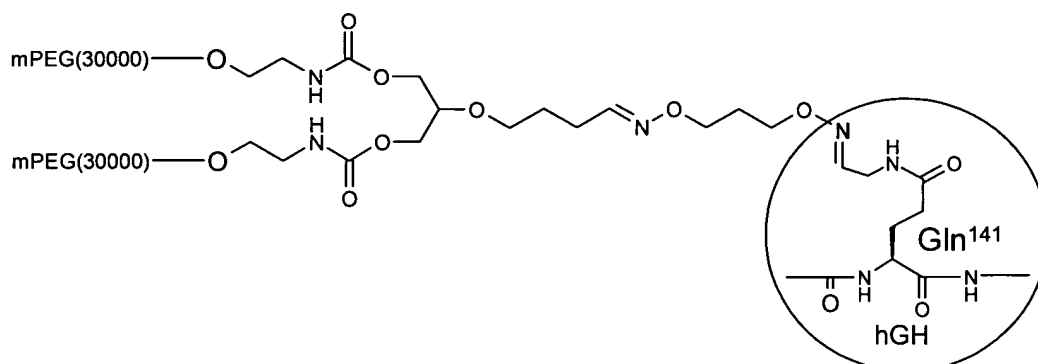
200 mg do precipitado seco foram dissolvidos em 5 ml DCM e 5 ml TFA foram adicionado. Após 30 min, a mistura foi concentrada em um evaporador giratório e extraída com 10 ml etanol duas vezes. O óleo residual foi redissolvido em uma mistura de 0,5 ml DMF e 2 ml DCM e precipitado e lavado com éter dietílico. Isto foi repetido uma vez mais e o derivado PEG precipitado foi secado e dissolvido em tampão 1 ml (0,3 M MES, pH 6,5)

O produto transaminado obtido em (a) foi dissolvido em tampão (20 mM trietanolamina, pH 8,5) e 3-(metiltio)-1-propanol (1 ml de uma solução 683 mM) foi adicionado. Então, periodato de sódio (5 mg, 10 eq.) foi adicionado e a mistura foi deixada reagir 30 min antes de ser lavada três vezes com solução de metionina aquosa (168 mM) e concentrada a 4,5 ml usando um dispositivo de ultrafiltração (Amicon Ultra-15, Millipore). Então 0,5 ml N-metil-pirrolidona resfriada com gelo foi adicionado e é lentamente adicionado a solução do derivado PEG e a mistura é deixada reagir durante a noite.

O tampão da mistura de reação foi trocado em uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01) que foi pré-equilibrada e eluída com tampão (tris 10 mM, pH 8,5) e a poça foi aplicada a uma coluna de troca iônica (HiLoad 26/10 QSepharose, Amersham Biosciences cat. No. 17-1066-01) pré-equilibrada em 10 mM Tris pH 8,5 e eluída com um gradiente de 0,2M NaCl em 10 mM Tris pH 8,5 a um fluxo de 4 ml/ min para 10 volumes de coluna. As frações contendo hGH PEGuilado de acordo com RP-HPLC foram reunidas e o tampão trocado em uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01) que foi pré-equilibrada e eluída com tampão (bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,5). A poça foi liofilizada. O rendimento do composto alvo foi de 3,25 mg.

Exemplo 6

Preparação de $N^{\epsilon 141}$ -[2-(3-(4-((1,3-bis(mPeg(30000)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butilideno)aminoxi)propiloxiimino)etil] hGH (VII.)



hGH (100 mg) foi dissolvido em tampão (7 ml, fosfato de mono-sódio 125 mM, pH 6,0). 1,3- bis-aminopropano,2HCl (2,0 g em 5,0 ml 125 mM fosfato de mono-sódio, ajustado a pH 6,0) foi adicionado e finalmente TGase (Activa WM, Ajinomoto, 30 mg em 2 ml fosfato de mono-sódio 125 mM, pH 6,0) foi adicionado e o volume ajustado a 30 ml com tampão fosfato de mono-sódio (125 mM, pH 6,0).

Após 4 h a 37°C, a reação foi parada por adição de NEM (100 ul, 100mM NEM). Após mais 1 h a 37°C, o bis-aminopropano em excesso foi removido e o tampão trocado em uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01) que foi pré-equilibrada e eluída com tampão (Tris 10 mM, pH 8,5).

A uma poça contendo proteína (32 ml contendo 82 mg de proteína) foi adicionada em gotas uma solução de um aldeído 60 kDa 2-arm PEG (Nektar, 083Y0V01 MPEG2-BUTYRALD-60K, 800mg em 10 ml água). Após incubação a temperatura ambiente durante a noite, o tampão foi trocado em quatro porções em uma coluna de dessalinização (HiPrep 26/10 Amersham Biosciences cat. No. 17-5087-01) a 10 mM Tris pH 8,5. A poça contendo proteína combinada foi aplicada em três porções a uma coluna MonoQ 10/100 GL equilibrada em 10 mM Tris pH 8,5 e eluída com um gradiente de 0,2M NaCl em 10 mM Tris pH 8,5 a um fluxo de 4 ml/ min para

20 volumes de coluna. As frações contendo o composto alvo foram coletadas, trocadas em tampão e re-cromatografadas como acima. Finalmente, as frações contendo o composto alvo foram reunidas e a poça foi aplicada a uma coluna de filtração de gel HiLoad 26/60 Superdex 200 PG. (Amersham Biosciences cat. No. 171071-01) que foi pré-equilibrada e eluída com 50 mM bicarbonato de amônio. As frações contendo o composto alvo foram reunidas e liofilizadas. O rendimento foi de 35,74 mg do produto desejado.

MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

Teste (I) Teste BAF hGH-R para determinar a atividade de hormônio de crescimento *in vivo*

O teste BAF-hGH-R é um teste de proliferação *in vitro*, onde as células BAF-3 foram modificadas para serem dependentes de hormônio de crescimento (GH) para crescimento e sobrevivência. BAF-3 é uma linhagem de células pro-B derivadas de medula óssea de murinos imortalizada. Originalmente, as células BAF-3 são dependentes de IL-3 para crescimento e sobrevivência. A sinalização de IL-3 é iniciada quando uma molécula de IL-3 liga e dimeriza dois receptores de IL-3. Isto leva à ativação de via de sinalização JAK-2/STAT e, assim, regulação de transcrição de genes importante para o crescimento e sobrevivência. O receptor de GH (GH-R) pertence à mesma superfamília de receptor como o IL-3R (A superfamília de receptor de citocina/ hematopoietina) e compartilha a mesma via de sinalização intracelular JAK/ STAT. Assim, após transfecção do GH-R humano na linhagem de células BAF-3, a linhagem de células se tornou uma linhagem de células dependente de GH. A linhagem de células mostra uma estimulação relacionada com a dose de crescimento por adição de concentrações crescentes de GH humano ou composto de teste.

O teste BAF hGH-R é iniciada deixando em privação as células para hGH (meio de cultura sem hGH) durante 24 h a 37 °C e 5% CO₂. AS células são centrifugadas, o meio é removido e as células são re-colocadas

em suspensão em meio de privação. 20,000 células /cavidade são semeadas em placas de micro-titulação (96 poços NUNC TC micropoço 96F SI w/lid NUNCLON D cat. No. 167008). GH humano (em concentrações diferentes) ou composto de teste (em concentrações diferentes) é adicionado às células, e as placas são incubadas durante 68 horas a 37°C e 5% CO₂.

A atividade metabólica das células é medida por AlamarBlue® (BioSource cat no Dal 1025). AlamarBlue é um indicador redox, que é reduzido por reações inatas ao metabolismo celular e, assim, provê uma medida indireta do número de células viáveis. AlamarBlue® é adicionado a cada cavidade e as células são incubadas durante mais 4 horas. A absorbância é medida em uma leitora de placa de fluorescência usando um filtro de excitação de 544 nM e um filtro de emissão de 590 nM.

A absorbância das amostras é traçada em gráfico como uma função da concentração de GH/ composto de teste. A partir das curvas de resposta a dose expressadas pelo valor de EC₅₀ (a quantidade de GH/composto de teste que elícita metade da resposta máxima) pode ser calculada. Além disso, a atividade relativa *in vitro* atividade de um composto de teste pode ser descrita pelo valor de relação como definido como EC₅₀(composto)/EC₅₀(hGH). Um valor de relação acima de 1 indica que o composto de teste é menos potente comparado a GH humano.

Tabela 1 mostra os resultados para os compostos como descrito nos exemplos.

Tabela 1

Potência relativa *in vitro* de compostos diferentes de hGH descritos no exemplos no teste BAF hGH-R. Valores são Média ± desvio padrão (SD)

Composto de	Relação EC ₅₀ (composto)/EC ₅₀ (hGH) [Média±desvio padrão]
Exemplo 1	10 ± 5
Exemplo 2	6 ± 2
Exemplo 3	9 ± 1
Exemplo 4	10 ± 4
Exemplo 5	7 ± 2
Exemplo 6	20 ± 6

Farmacocinética

A Farmacocinética dos compostos dos exemplos foi investigada em ratos Spraque Dawley machos após administração única intravenosa (i.v.) e subcutânea (s.c.).

5 Os compostos de teste foram diluídos a uma concentração final de 1 mg/ml em um tampão de diluição consistindo de: glicina 20 mg/ml, manitol 2 mg/ml, NaHCO₃ 2,5 mg/ml, pH ajustado a 8,2.

10 Os compostos de teste foram estudados em ratos Spraque Dawley machos pesando 250 g. Os compostos de teste foram administrados como uma injeção única ou i.v. na veia do rabo ou s.c. no pescoço com uma agulha 25 G a uma dose de 1 mg/kg de peso corporal.

Para cada composto de teste, a amostragem do sangue foi conduzida de acordo com seguinte esquema apresentado na Tabela 2.

Tabela 2

15 Esquema de amostragem de sangue para cada composto de teste

Animal no.	RoA	Tempo de 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			

20 Em cada tempo de amostragem, 0,25 ml de sangue foi retirados da veia da cauda usando uma agulha 25 G. O sangue foi amostrado em um tubo de teste revestido com EDTA e armazenado em gelo até a centrifugação a 1200 x G durante 10 min a 4°C. Plasma foi transferido para um tubo Micronic e armazenado a -20°C até análise.

As concentrações de composto de teste foram determinadas por ELISA sandwich usando um anticorpo policlonal anti-hGH de porquinho-

da-índia como o captador, e proteína de ligação de hGH biotinilado (parte solúvel de receptor de GH humano) como detector. O limite de detecção do teste foi 0,2 nM.

- 5 Uma análise farmacocinética não compartimentar foi realizada em perfis de concentração tempo médios de cada composto de teste usando WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA). O parâmetro farmacocinético estima a meia-vida terminal ($t_{1/2}$) e tempo de residência médio (MRT) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

- 10 Meia-vida ($t_{1/2}$) e tempo de residência médio (MRT) de compostos hGH dos exemplos em ratos Sprague Dawley após administração de dose única i.v. e s.c..

Composto de	RoA	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)
Exemplo 1	i.v.	8,3	12,7
Exemplo 2	i.v.	10,6	6,4
Exemplo 4	i.v.	4,7	9,6
Exemplo 6	i.v.	7,3	13,1

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Novo Nordisk

<120> Conjugação mediada por Tgase de hormônio de crescimento

<130> 7217.204 WO

<160> 1

<170> PatentIn Versão 3.3

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> Hormônio de crescimento humano

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

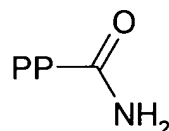
Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe
				165					170					175	

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

REIVINDICAÇÕES

1. Método para fixar covalentemente PEG a um polipeptídeo compreendendo pelo menos um resíduo de glutamina, caracterizado pelo fato de que compreende reagir, em uma ou mais etapas, este resíduo de glutamina

5 compreendendo polipeptídeo representado por fórmula [I]



[I]

em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no polipeptídeo, com um nucleófilo contendo nitrogênio de fórmula

[II]



[II]

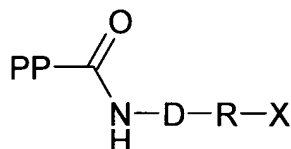
10 em que D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação única;

R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$, ou C_{5-15} heteroalquilenos;

X representa $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído, uma cetona, ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um

15 aldeído ou uma cetona;

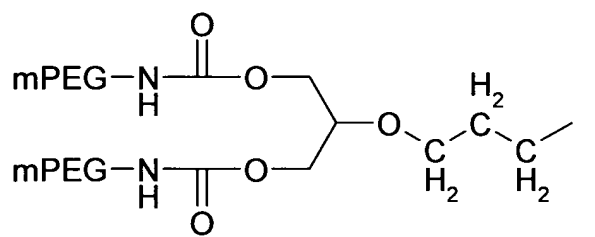
na presença de transglutaminase para formar um polipeptídeo transaminado de fórmula [III]



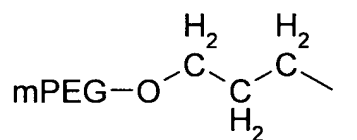
[III]

opcionalmente, se X é um grupo latente, transformar referido grupo latente em $-\text{O}-\text{NH}_2$, um aldeído ou uma cetona,

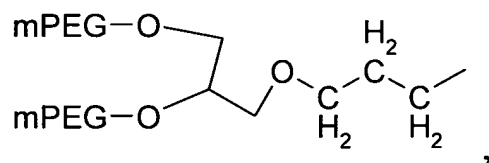
20 referido polipeptídeo transaminado sendo ainda reagido com



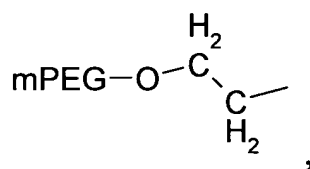
,



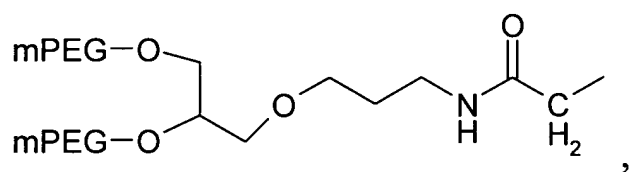
,



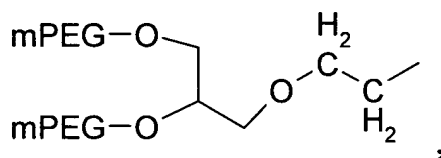
,



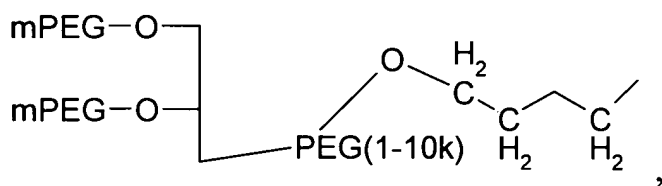
,



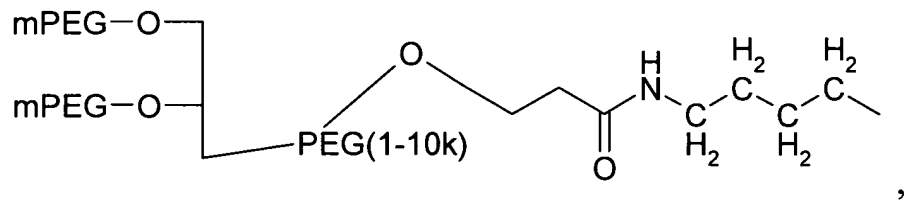
,



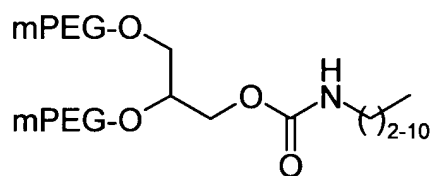
,



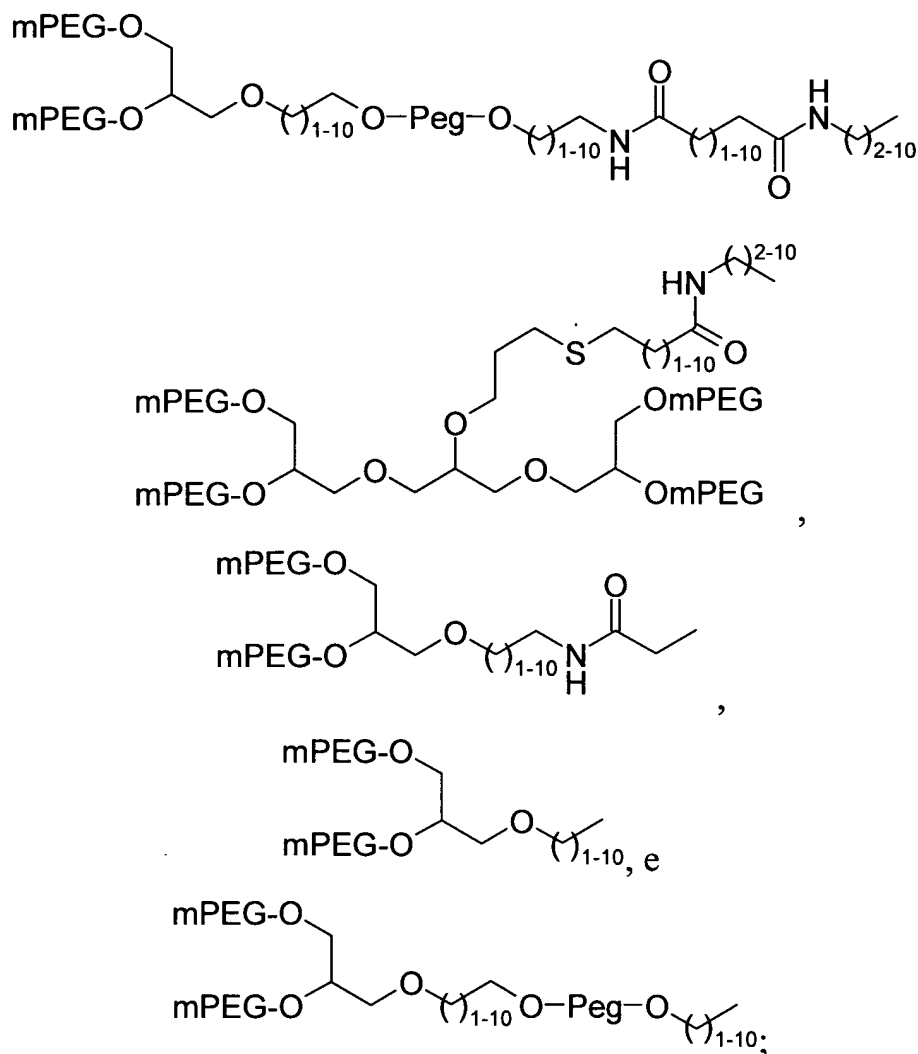
,



,

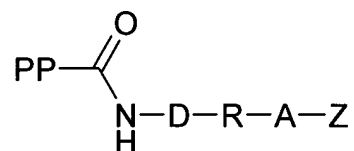


,



em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;

desde que se Z é , então PEG é 10 kDa PEG para formar um PEGuilado polipeptídeo de fórmula [V]



[V]

em que A representa uma ligação oxima;
ou qualquer sal, pró-droga ou solvato farmacêuticamente

aceitável do mesmo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que D representa -O-.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que D representa uma ligação única.

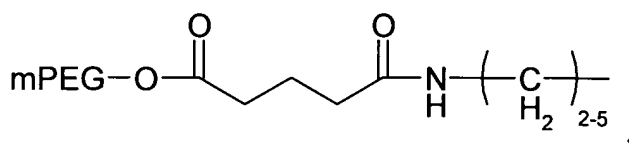
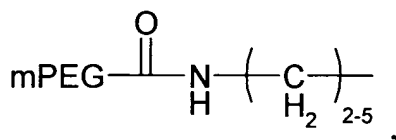
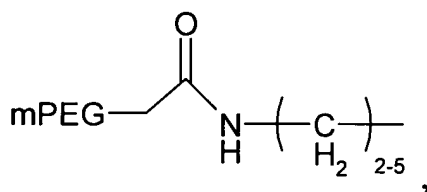
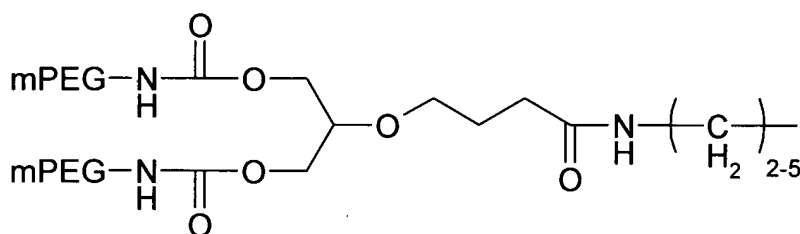
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R representa $-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$ ou $-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$.

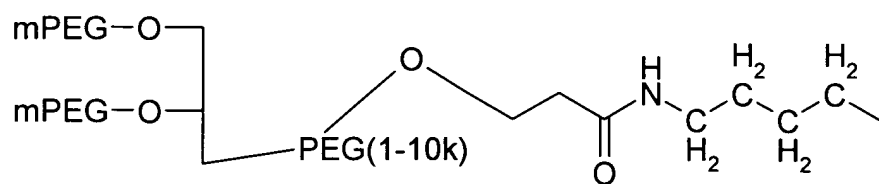
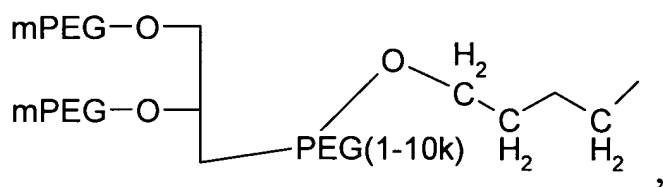
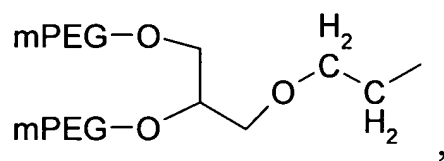
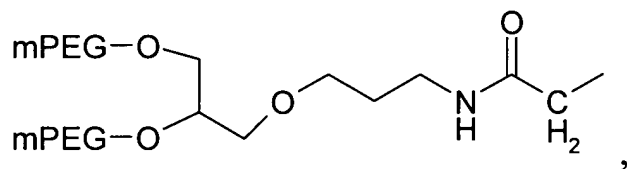
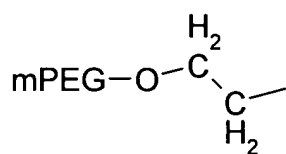
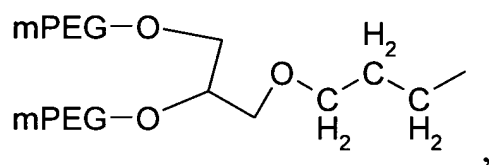
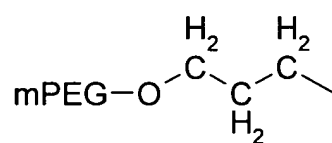
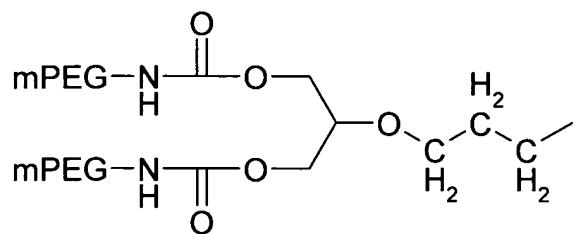
5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R representa C_{1-6} alquilenos.

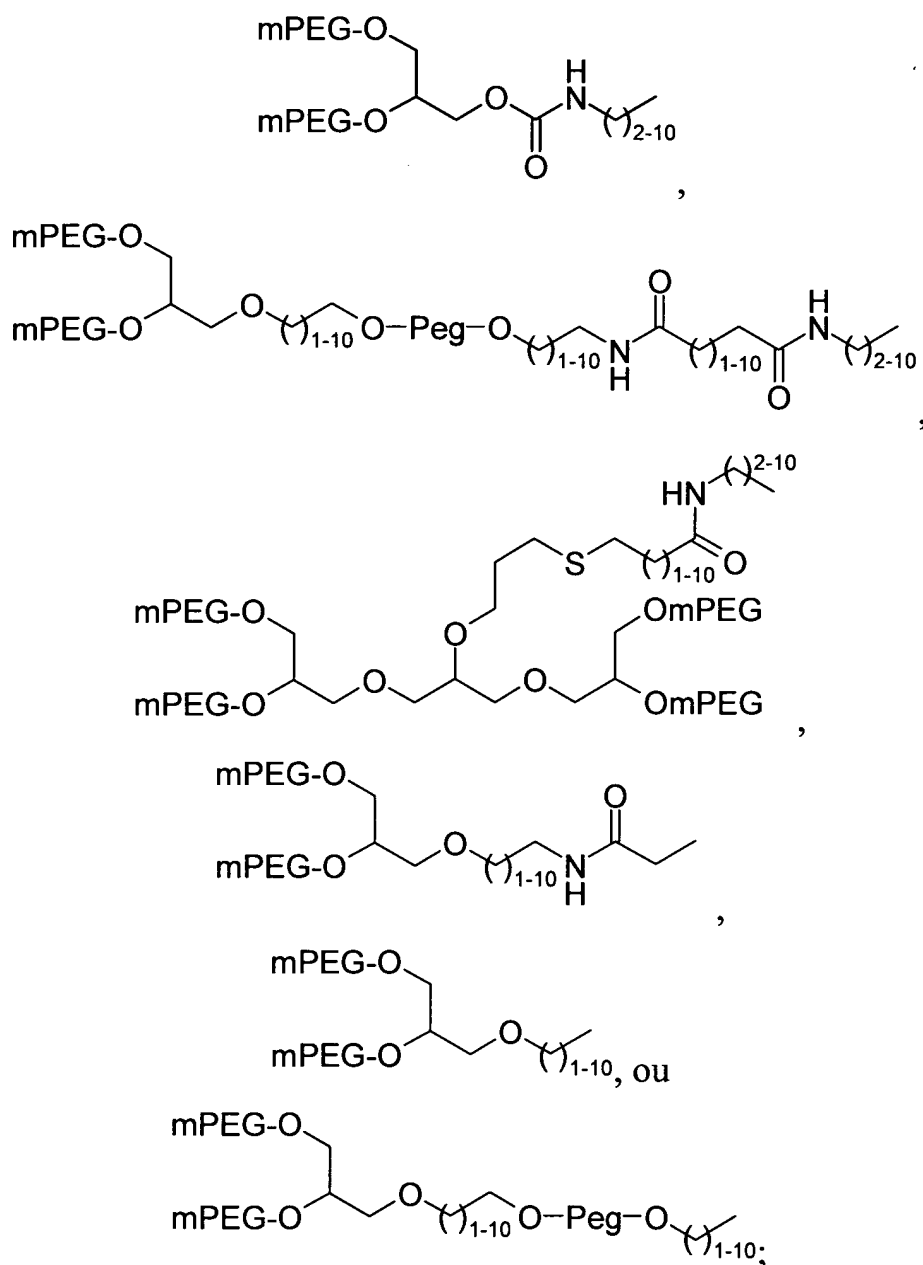
6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que R representa C_{1-3} alquilenos.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R representa metileno ou propileno.

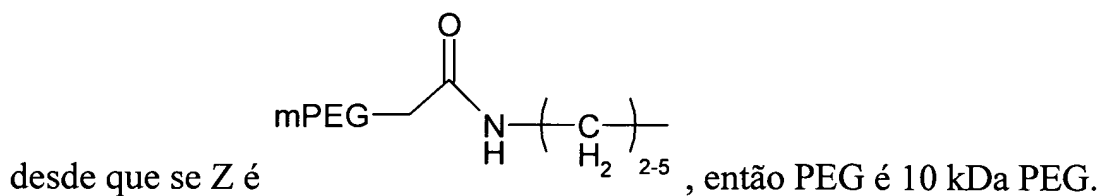
8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$ e X representa um aldeído ou um grupo latente, que pode ser ainda reagido para formar um aldeído.

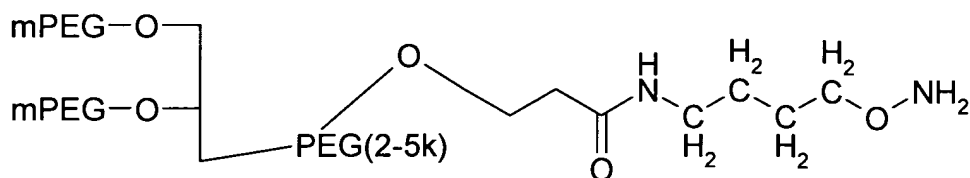
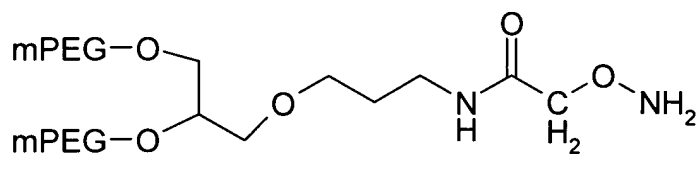
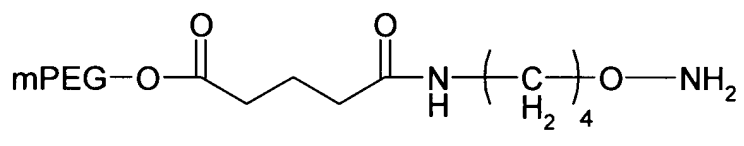
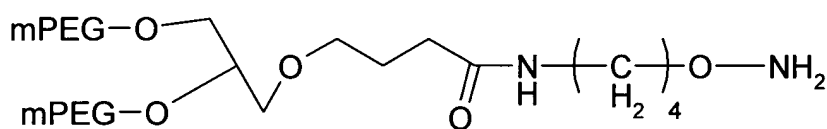
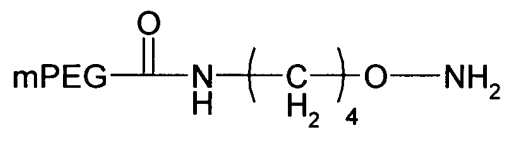
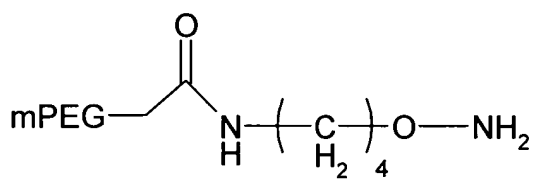
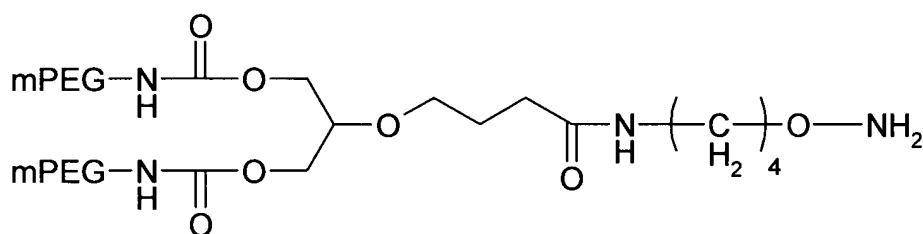
10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$ e X representa uma cetona ou um grupo latente que pode ser ainda reagido para formar uma cetona.

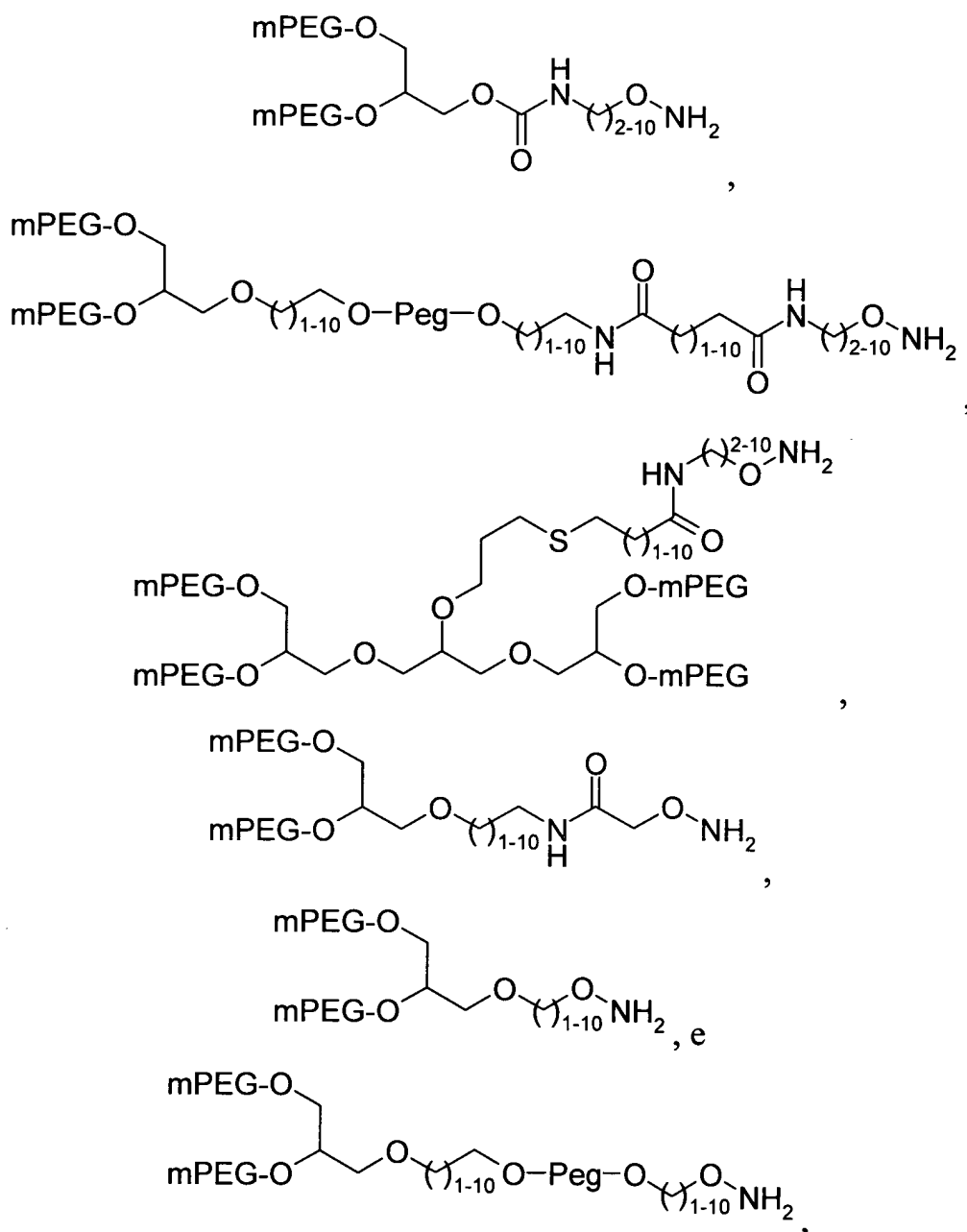
5 11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre





em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

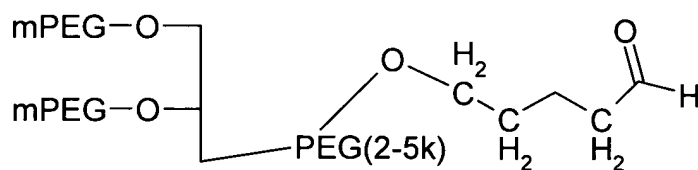
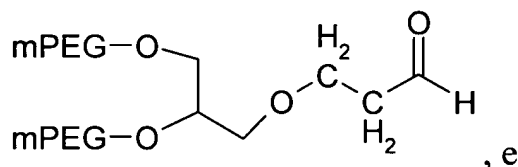
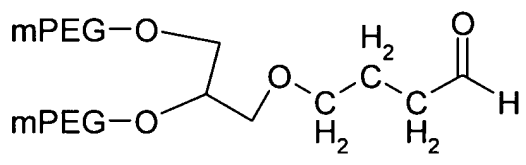
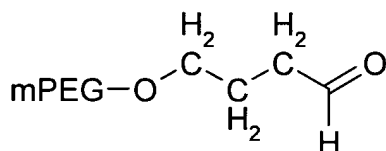
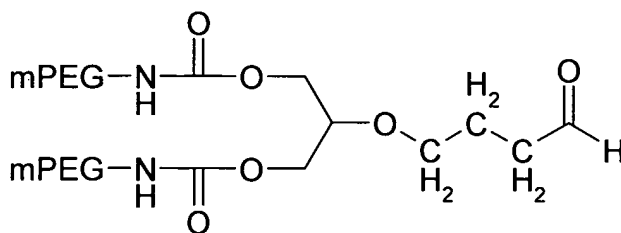
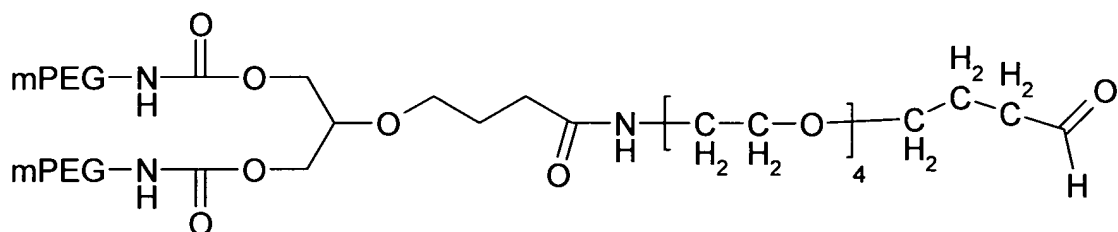
12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que Y representa um aldeído e X representa -O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula [IV]

Y-Z

[IV]

representa um composto selecionado dentre



em que, salvo indicado em contrário, mPEG significa mPEG com um peso molecular de 10 kDa, 20 kDa ou 30 kDa e PEG significa PEG com um peso molecular entre 2 kDa e 5 kDa.

5

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que Y representa uma cetona e X representa O-NH₂ ou um grupo latente que, quando de outra reação, pode ser transformado em -O-NH₂.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula [III]



[II]

representa 1,3-diamino-2-propanol, e

Y representa $-\text{O}-\text{NH}_2$.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula [II]



[II]

5 representa 1,3-diaminoóxi propano, e

Y representa um aldeído.

18. Método para modificar propriedades farmacológicas de hormônio de crescimento, caracterizado pelo fato de compreender covalentemente fixar PEG ao referido hormônio de crescimento de acordo com um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que referido resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representa um hormônio de crescimento humano.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que referido resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento representa

a) um hGH compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID No.1,

b) 20 kDa hGH,

25 c) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído

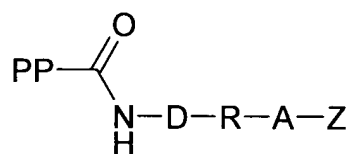
com outro aminoácido,

d) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, ou

5 e) um hGH em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido, e onde um resíduo de glutamina está presente em outra posição no hormônio de crescimento.

10 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que referido hormônio de crescimento representa hGH.

23. Composto e sais, pró-drogas ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis do mesmo, caracterizado pelo fato de ser de acordo com a fórmula [V]



[V]

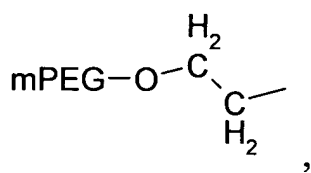
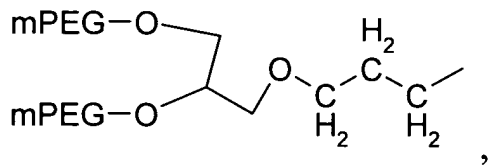
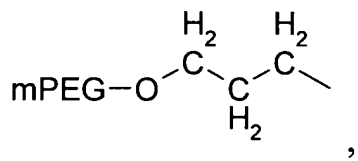
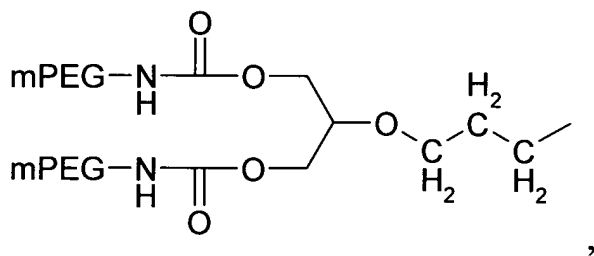
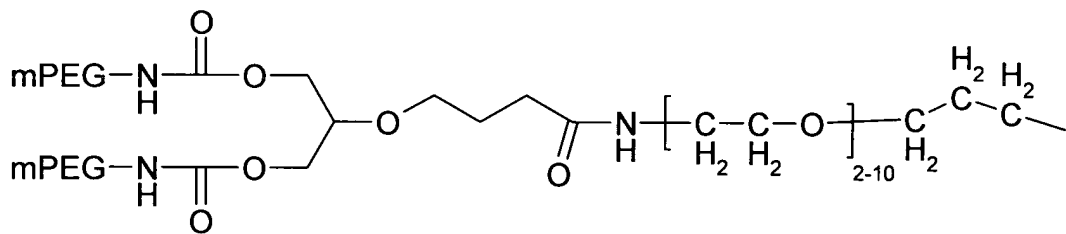
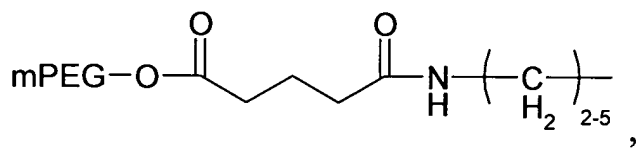
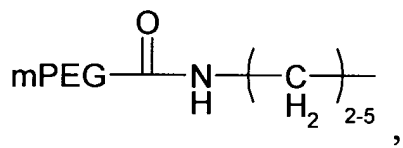
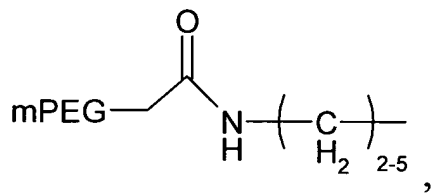
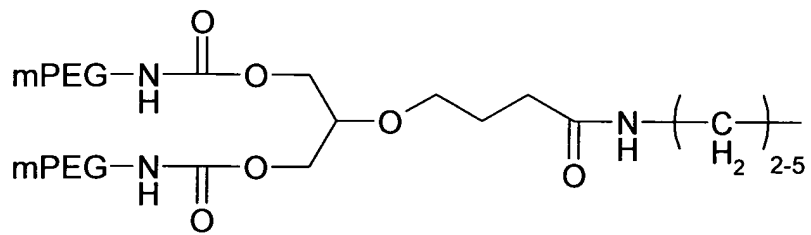
15 em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente no polipeptídeo;

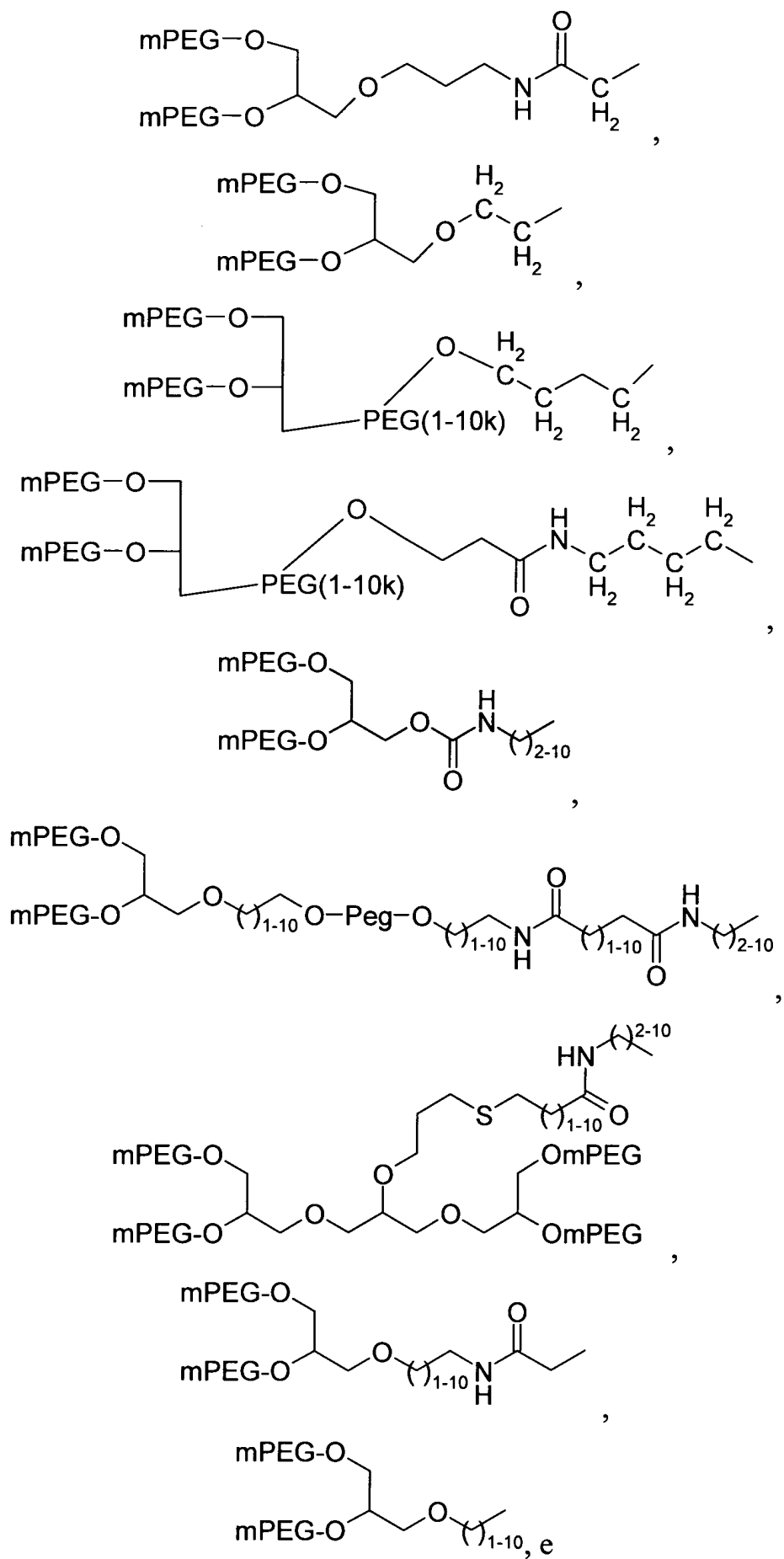
D representa $-\text{O}-$ ou uma ligação;

R representa C_{1-6} alquilenos, $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$,
20 $-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ou C_{5-15} heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

Z representa uma porção selecionada dentre





$$\text{mPEG}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{2.5}$$

24. Composto de acordo com a reivindicação 23, caracterizado

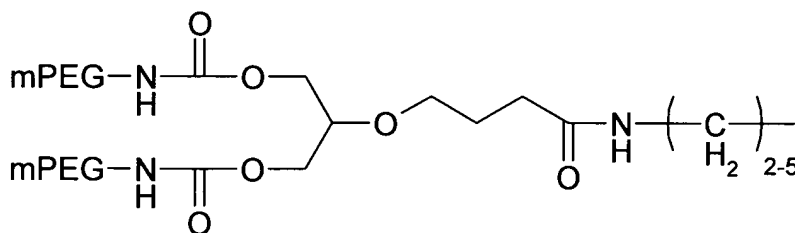
25. Composto de acordo com a reivindicação 23, caracterizado

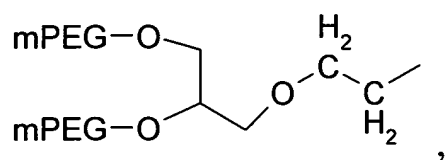
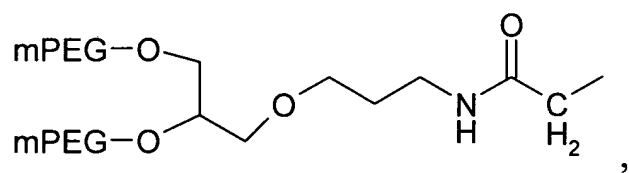
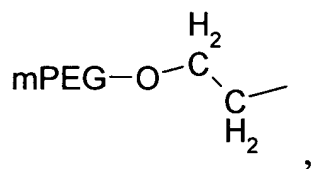
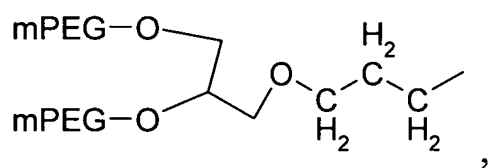
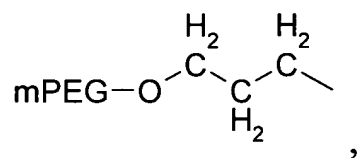
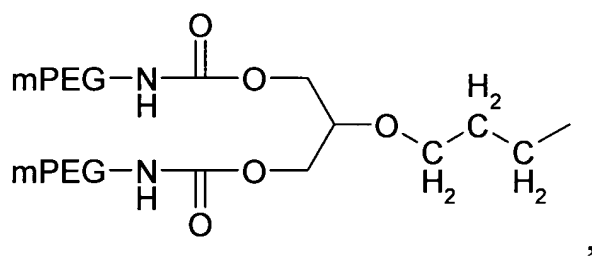
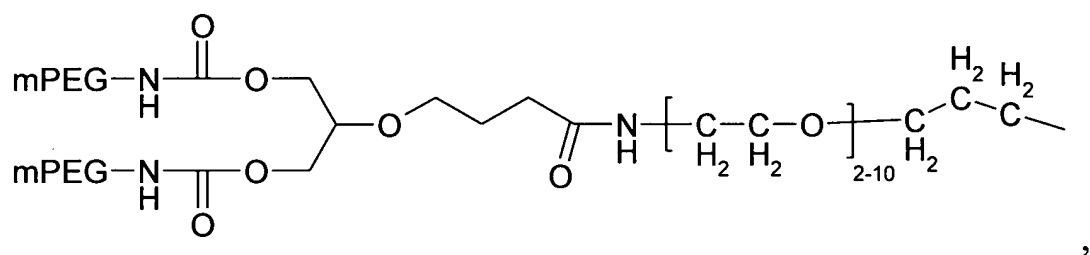
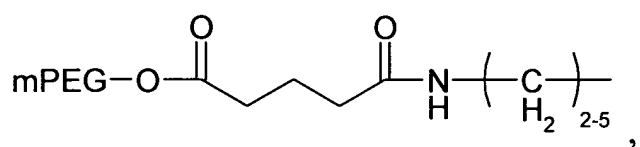
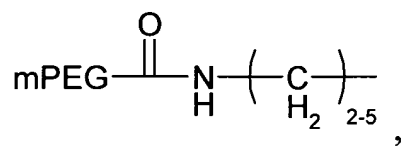
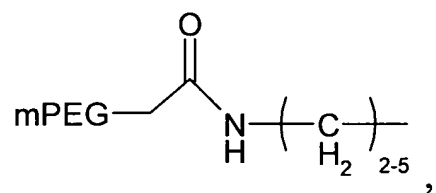
26. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações

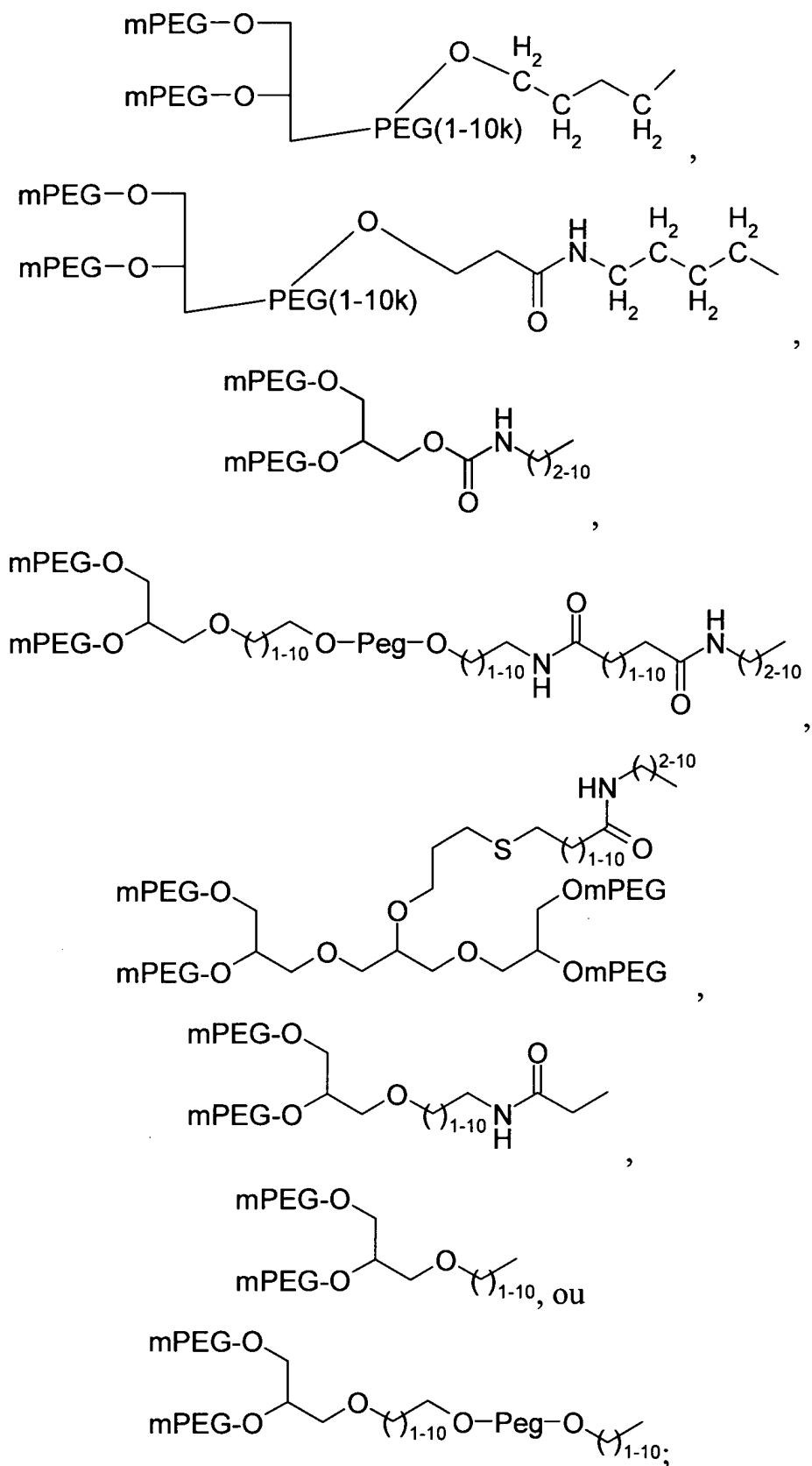
27. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriormente pelo fato de que R representa C₁₋₆alquilenos.

29. Composto de acordo com a reivindicação 28, caracterizado

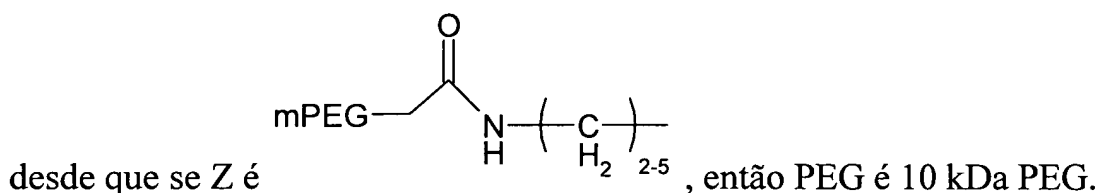
30. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações
 erizado pelo fato de que Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



31. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 30, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em hormônio de crescimento.

32. Composto de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em um hGH compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

33. Composto de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em 20 kDa hGH.

34. Composto de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de

a) o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1; ou

b) o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina presente em uma posição diferente da posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 e diferente da posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foram, cada, deletados ou substituídos com outro aminoácido..

35. Composto de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de ser selecionado dentre

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

5 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

10 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

15 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

25 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}aminox)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

5 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)
propilideno}aminox)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)
prop-2-iloxi)butiril}aminobutil)-oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}
10 aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)
butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

15 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno}aminox)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminox)propilóxi hGH;

20 $N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno}aminox)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)
butilideno}aminox)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno}aminox)propilóxi
25 hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno}aminox)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)prop-1-iloxi)PEGuiloxi}
butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141/40}$ -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)
butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

5 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)
prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)
oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)
butilideno}aminoxil)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

20 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}
aminoxil)propilóxi hGH;

25 $N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi
hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil}-aminobutil)oximino)etil hGH;

5 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil}-aminobutil)oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno}-aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

20 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)propilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

25 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil}
aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)
5 butilideno}aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi
hGH;

10 $N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-
iloxi)butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno}aminoxi)propilóxi
hGH;

15 $N^{\delta 141}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)
propilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 141}$ -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-
il)PEGuiloxi}butilideno}aminoxi)propilóxi hGH;

20 $N^{\delta 141}$ -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)
butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(mPEG(10k)iloxi)butiril}aminobutil)
25 oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(10k)iloxi)propionil}aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)butiril}aminobutil) oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(10k)iloxi-5-oxopentanoil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(10k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

5 butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(10k)ilaminocarboniloxi)prop-2-
iloxi)butilideno}-aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(10k)iloxi)butilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

10 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-iloxi)butilideno}
aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(10k)iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi
hGH;

15 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)propiloxi)
propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(10k)iloxi)prop-1-
iloxi)propilideno} aminoxi)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-
2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(20k)iloxi)propionil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)
butiril} aminobutil)oximino)etil hGH;

25 $N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(20k)iloxi-5-oxopentanoil} aminobutil)
oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)
ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno} aminoxi)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-

iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(20k)iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)

5 butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(20k)iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)propiloxi)

propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

10 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-iloxi)

propilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butiril}-aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{3-(mPEG(30k)iloxi)propionil}aminobutil)

15 oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-

iloxi)butiril}aminobutil)oximino)etil hGH;

$N^{\delta 40}$ -2-(O-(4-{5-(mPEG(30k)iloxi-5-oxopentanoil}

aminobutil)oximino)etil hGH;

20 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(30k)

ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)

butilideno}aminoxil)prop-1-ilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(1,3-bis(mPEG(30k)ilaminocarboniloxi)prop-2-

iloxi)butilideno}-aminoxil)propilóxi hGH;

25 $N^{\delta 40}$ -3-({4-(mPEG(30k)iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-

iloxi)butilideno}aminoxil)propilóxi hGH;

$N^{\delta 40}$ -3-({3-(mPEG(30k)iloxi)propilideno}aminoxil)propilóxi

hGH;

N^{840} -2-(O-(2-(3-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)propiloxi)propilamino)-2-oxoetil)oximino)etil hGH;

5 N^{840} -3-({4-(2,3-bis(mPEG(30k)iloxi)prop-1-iloxi)propilideno}aminoxil)propiloxi hGH;

N^{840} -3-({4-((2,3-bis(mPEG(20k)iloxi)prop-1-il)PEGuiloxi)butilideno}aminoxil)propiloxi hGH;

N^{840} -2-((4-(4-((2,3-bis(mPEG(20k)il)propil)PEGuiloxi)butirilamino)butil)oximino)etil hGH;

10 N^{141} -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

N^{141} -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-butil)oxiimino)-etil] hGH;

15 N^{141} -(3-((4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno)aminoxil)propiloxi) hGH;

N^{141} -[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)propiloxi)carbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

20 N^{141} -[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)oximino)etil] hGH;

N^{141} -[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butilideno)aminoxil)propiloxiimino)etil] hGH;

$N^{141/40}$ -[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

25 $N^{141/40}$ -[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-butil)oxiimino)-etil] hGH;

$N^{141/40}$ -(3-((4-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno)aminoxil)propiloxi) hGH;

N^ε141/40-[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)propiloxicarbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

N^o141/40-[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)oximino)etil] hGH;

5 N^{ϵ} 141/40-[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-
2-propiloxi)butilideno)aminoxi)propiloxiimino)etil] hGH;

N^{ϵ} 40-[2-O-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)aminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)butil)oxiimino)etil] hGH;

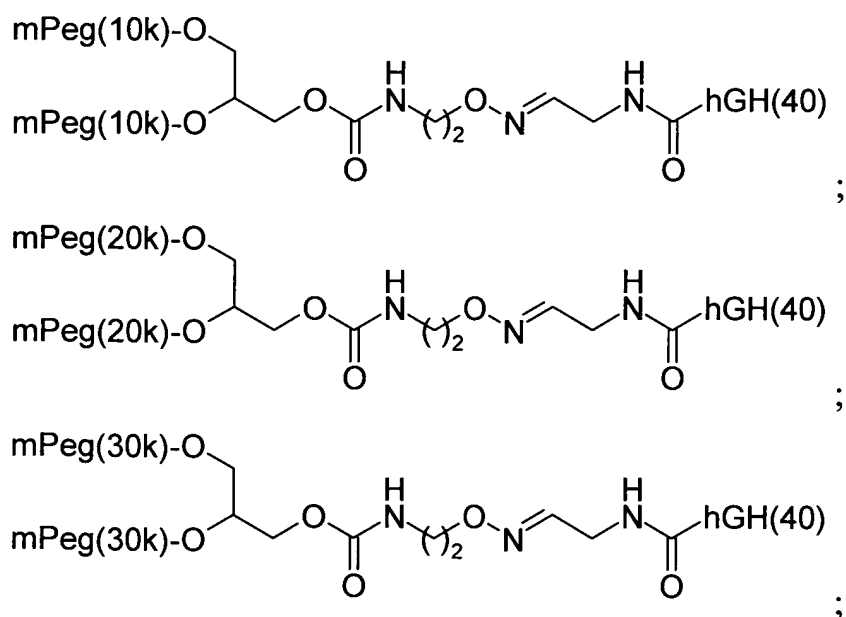
10 N^{ϵ} 40-[2-(O-(4-(4-(mPEG(30K)oxi)butirilamino)-
butil)oxiimino)-etil] hGH;

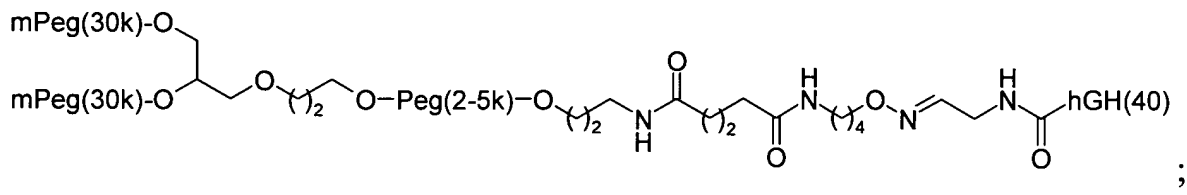
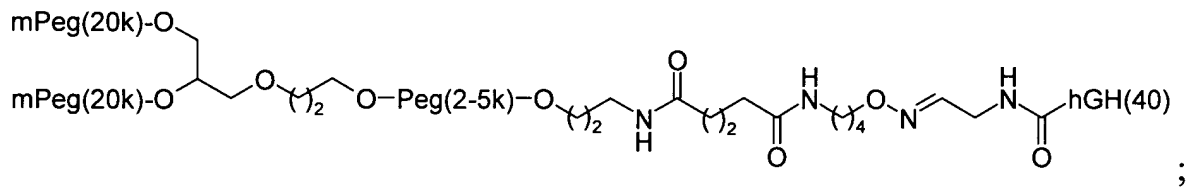
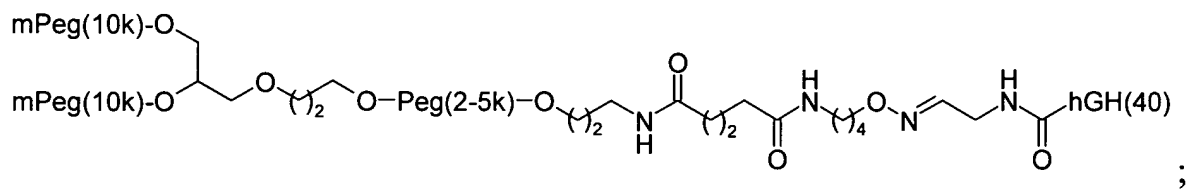
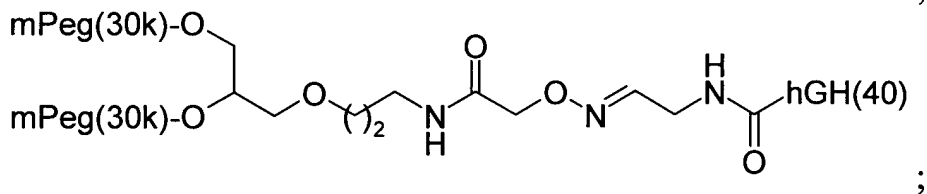
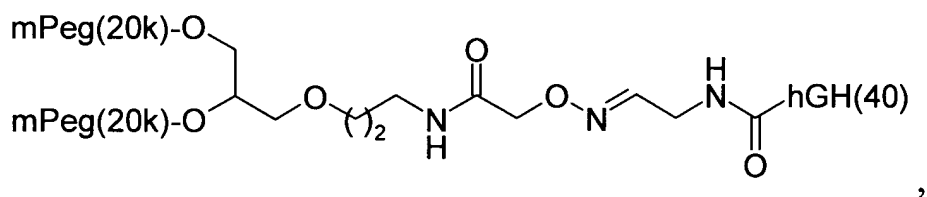
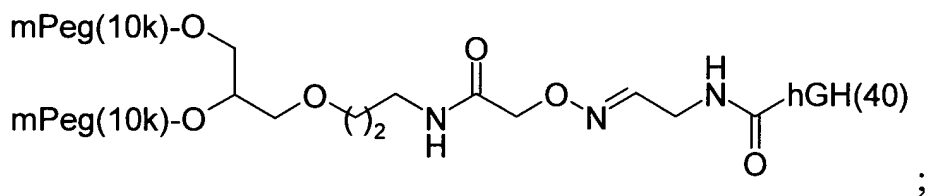
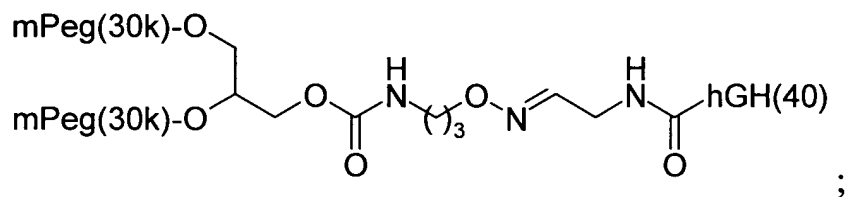
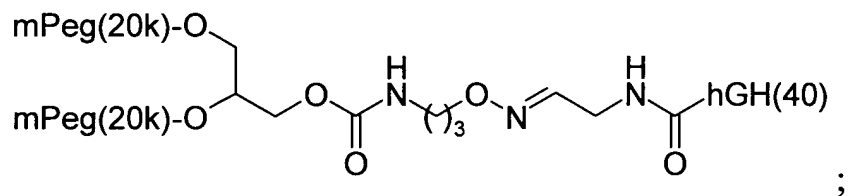
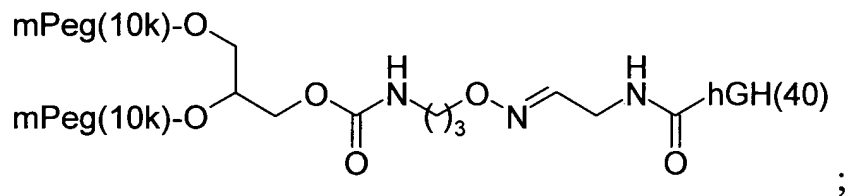
N^ε40-(3-((4-(2-(2-(2-(2-(4-(1,3-bis(mPEG(20K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butirilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)butilideno)aminoxi)propiloxi) hGH;

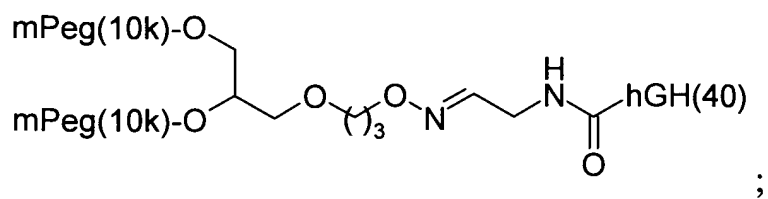
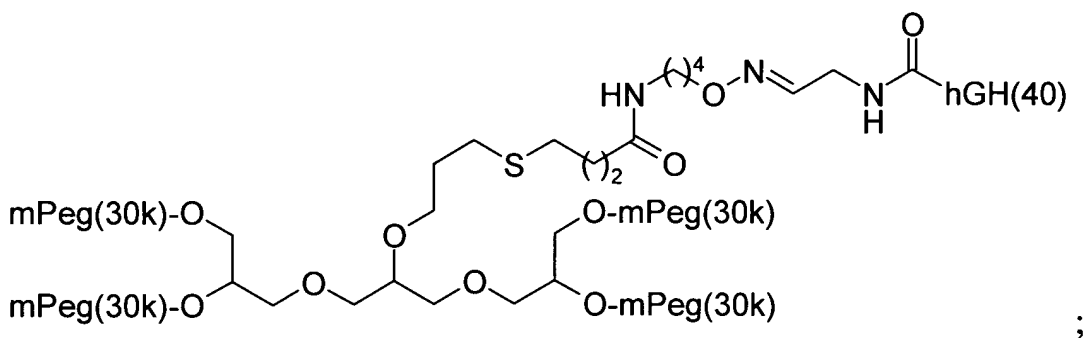
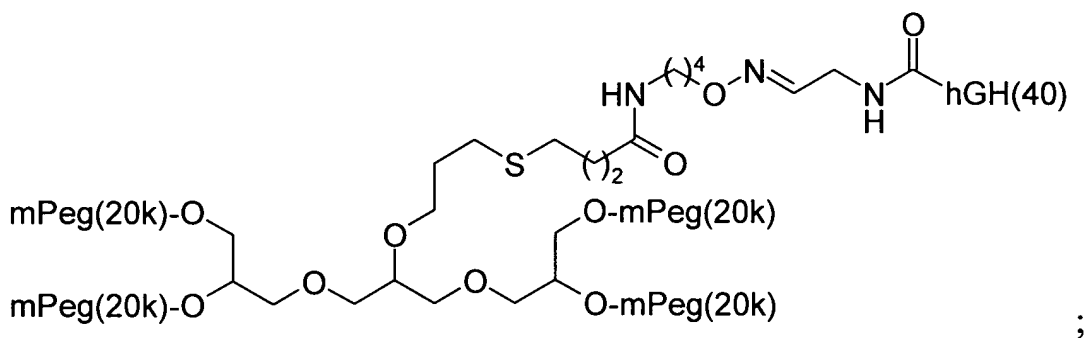
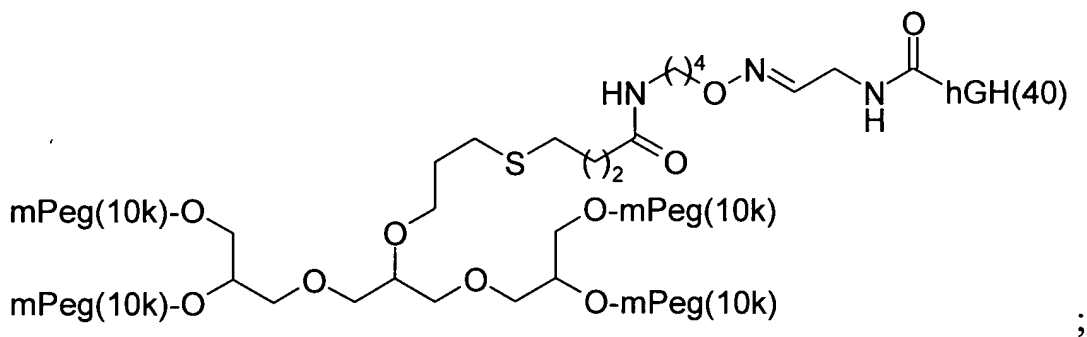
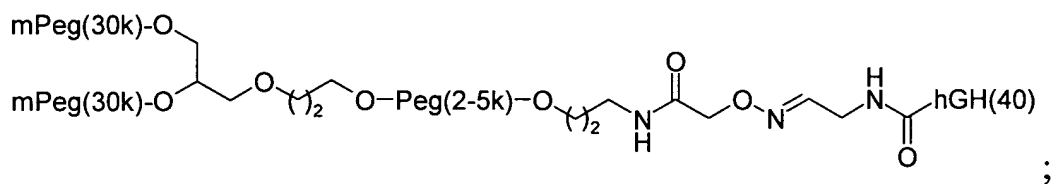
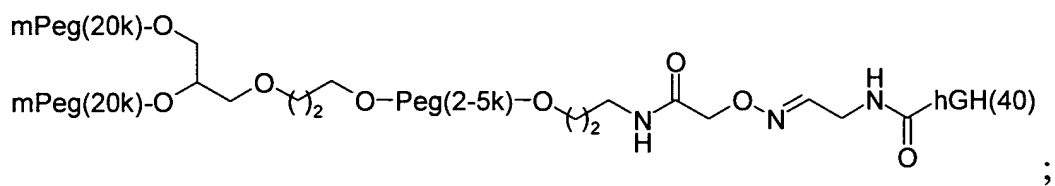
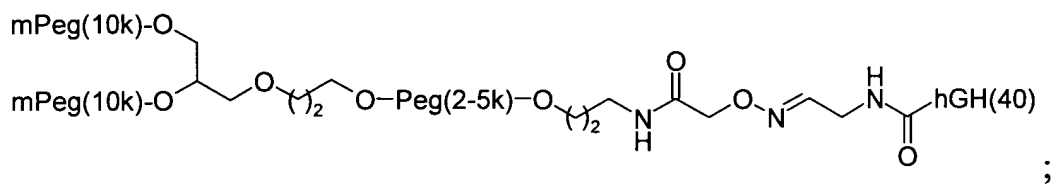
15 N^{ϵ} 40-[2-(2-(2,3-(mPEG(20K)iloxi)propiloxicarbonilamino)etiloximino)etil] hGH;

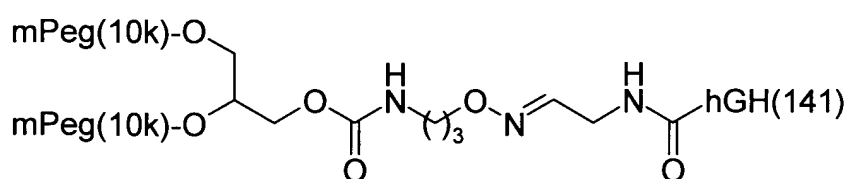
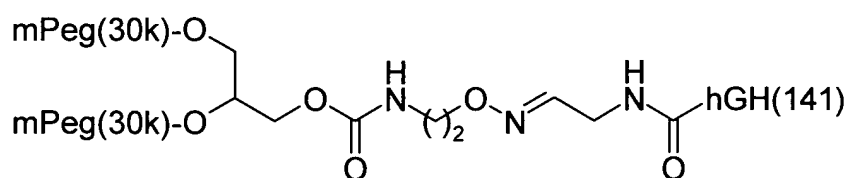
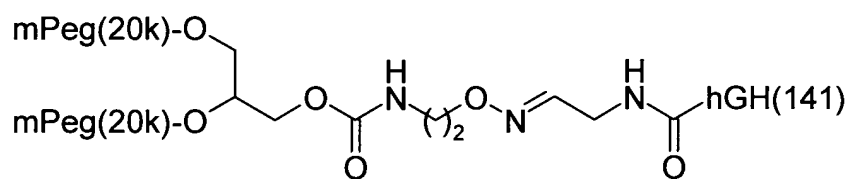
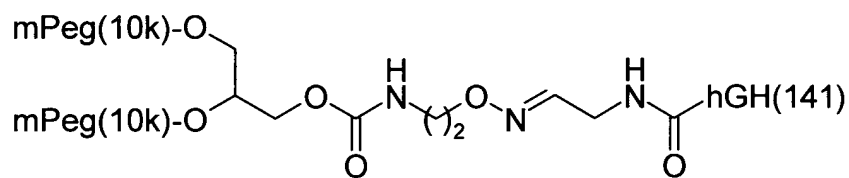
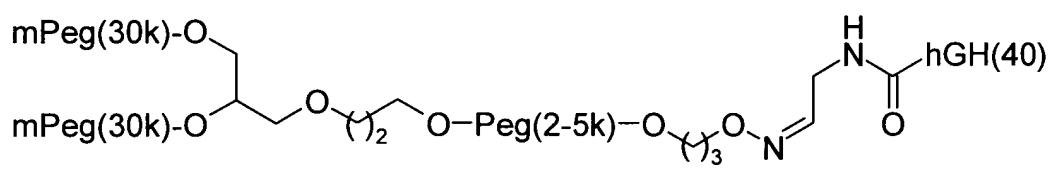
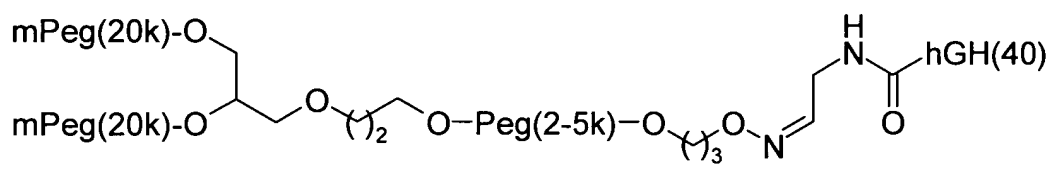
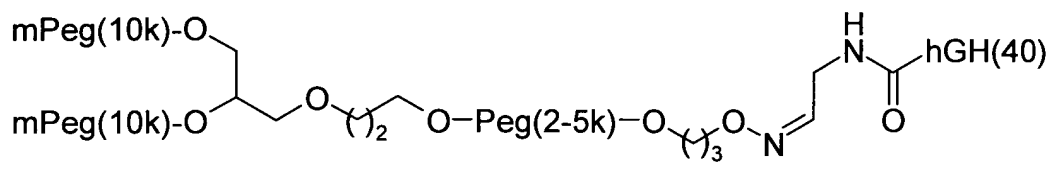
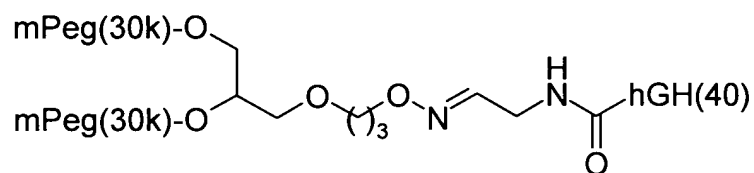
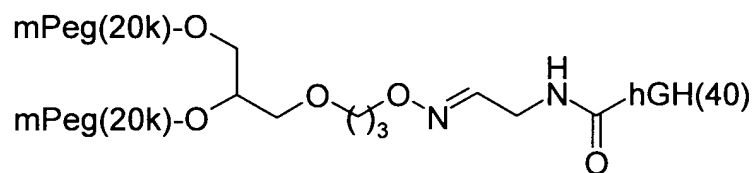
N^{ϵ} 40-[2-(O-(2-(2-(mPEG(40K)iloxi)etilamino)-2-oxoetil)oximino)etil] hGH;

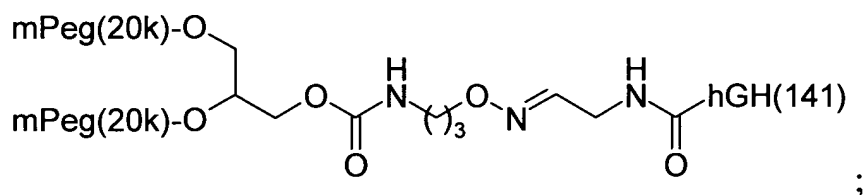
N^{ϵ} 40-[2-(3-(4-((1,3-bis(mPEG(30K)ilaminocarboniloxi)-2-propiloxi)butilideno)aminox)propiloxiimino)etil] hGH;



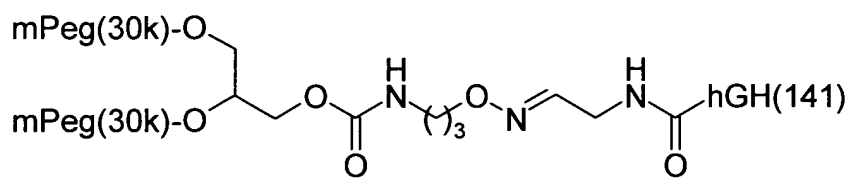




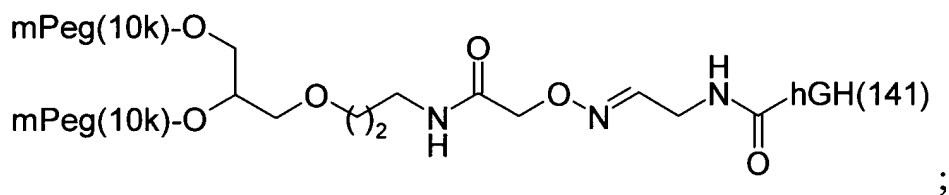




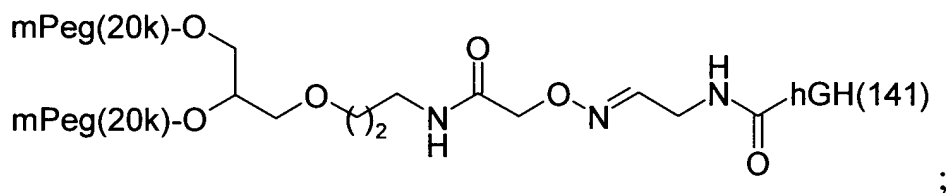
;



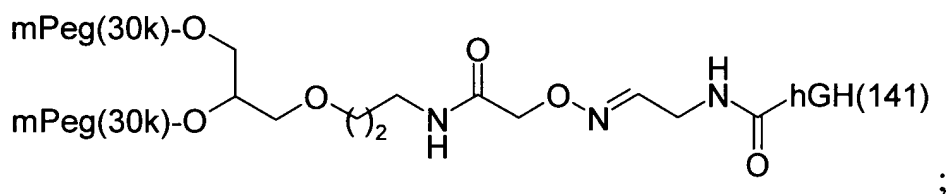
;



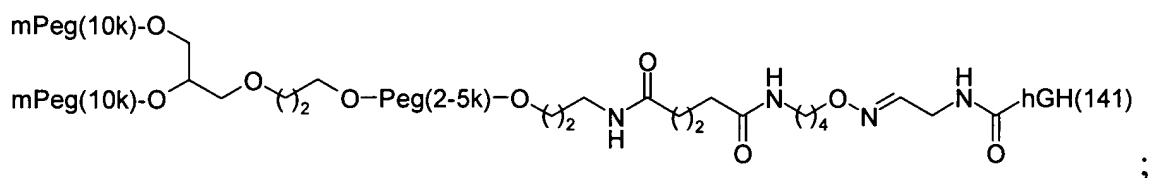
;



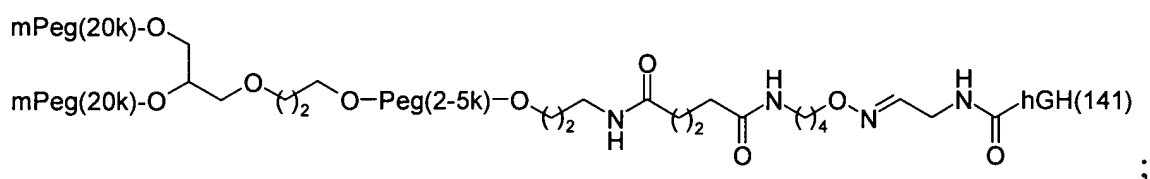
;



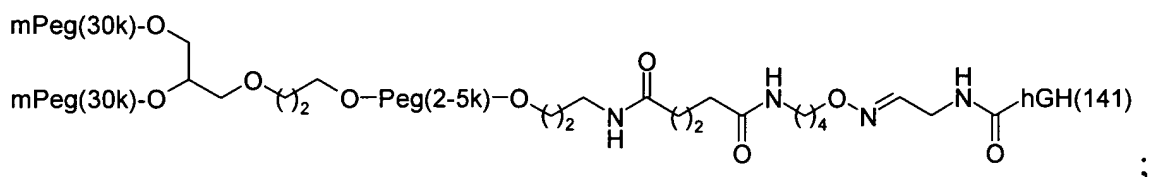
;



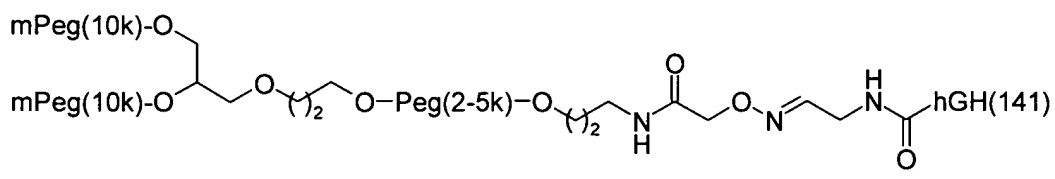
;



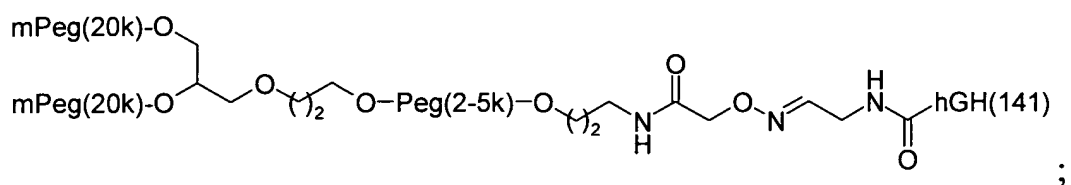
;



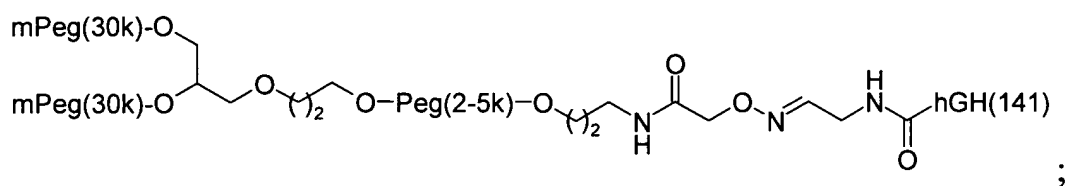
;



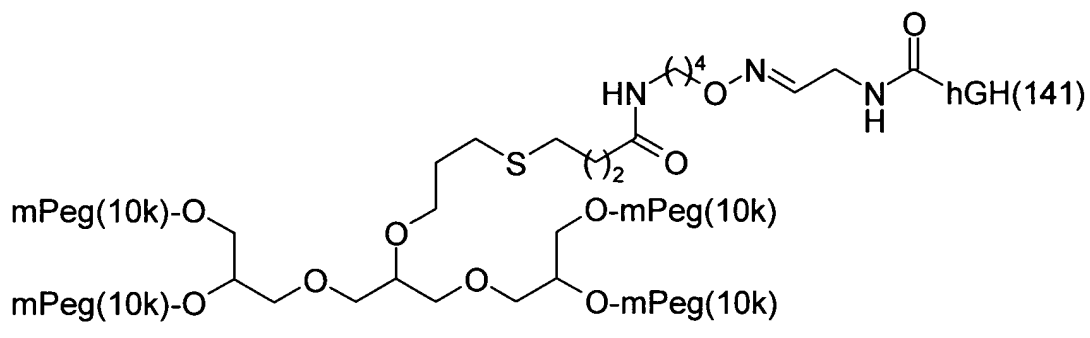
;



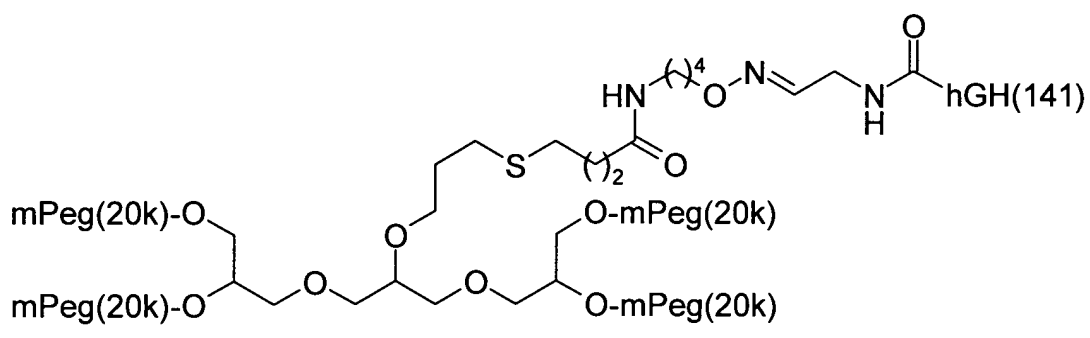
;



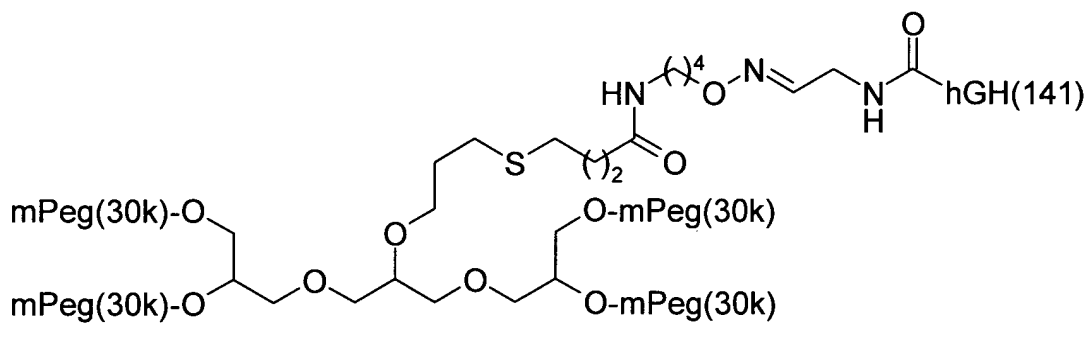
;



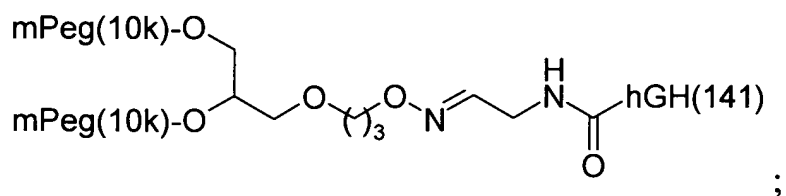
;



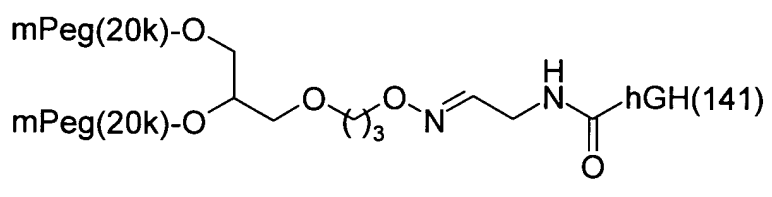
;



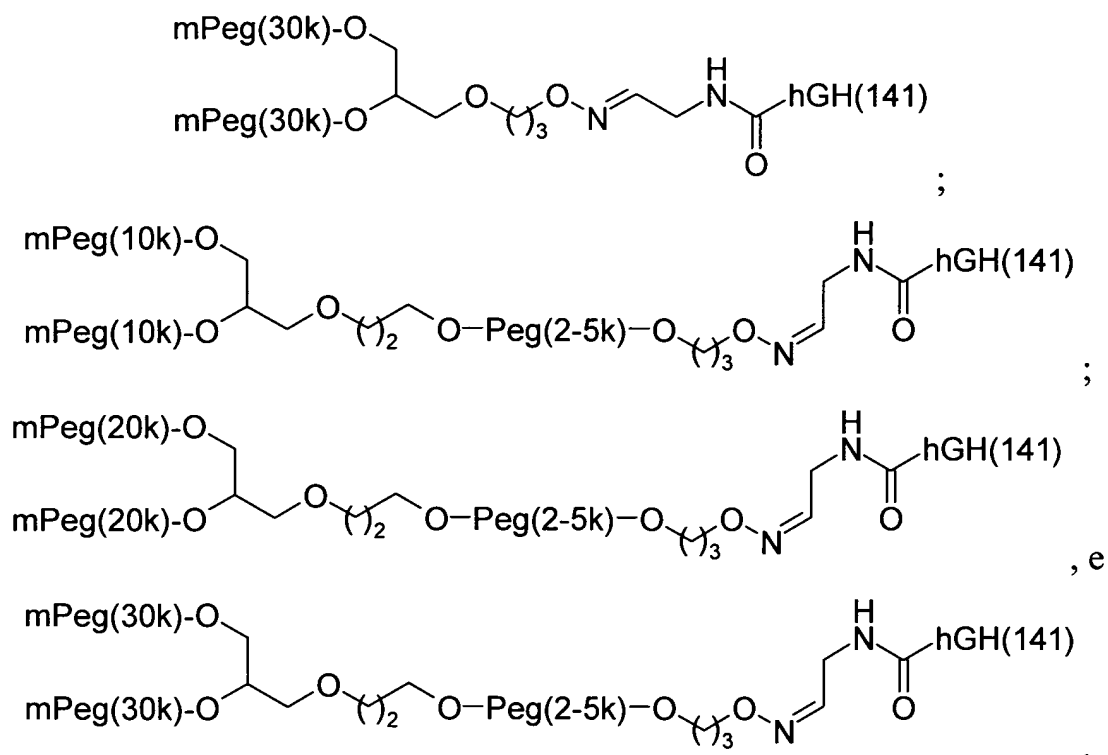
;



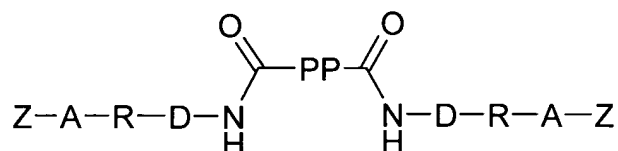
;



;



36. Composto e sais, pró-drogas ou solvatos farmacêuticamente aceitáveis do mesmo, caracterizado pelo fato de ser de acordo com a fórmula [VI]



[VI]

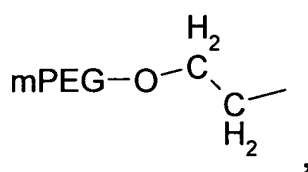
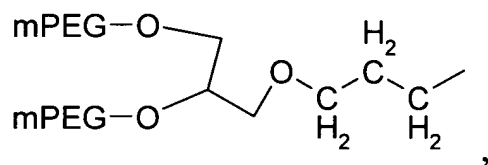
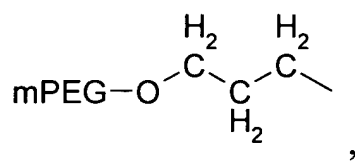
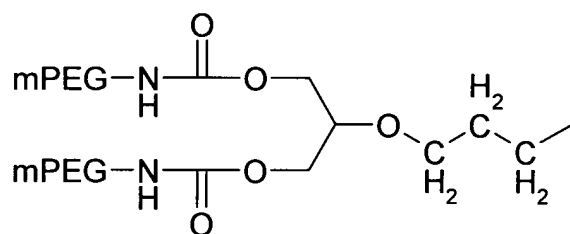
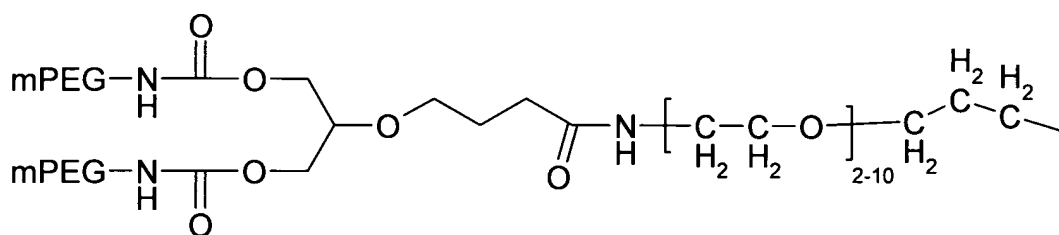
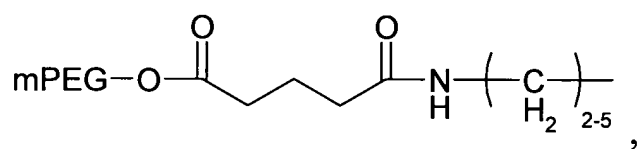
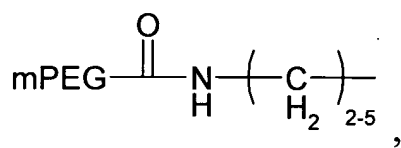
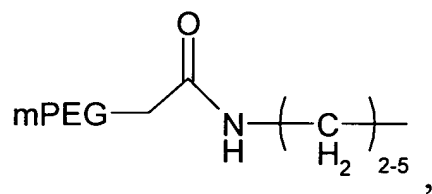
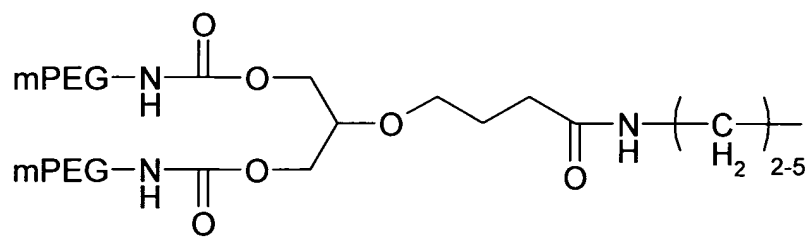
em que PP representa um radical de polipeptídeo obtido por remoção de -C(=O)-NH₂ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em referido polipeptídeo;

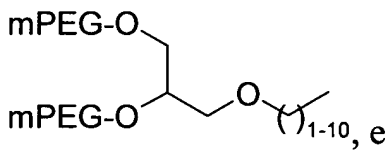
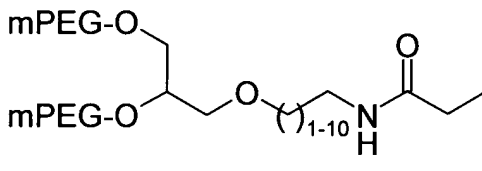
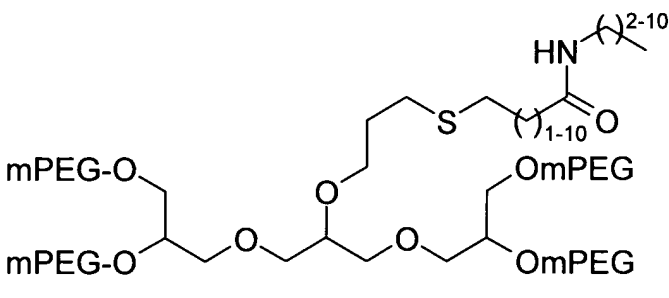
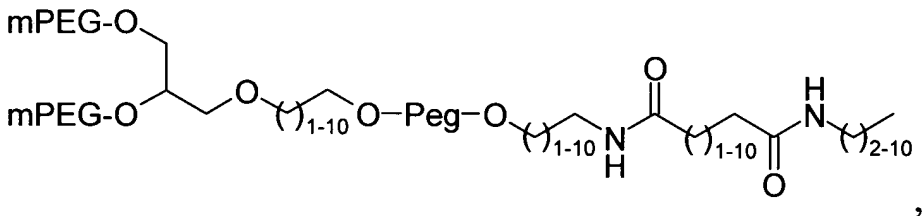
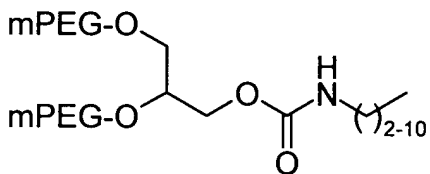
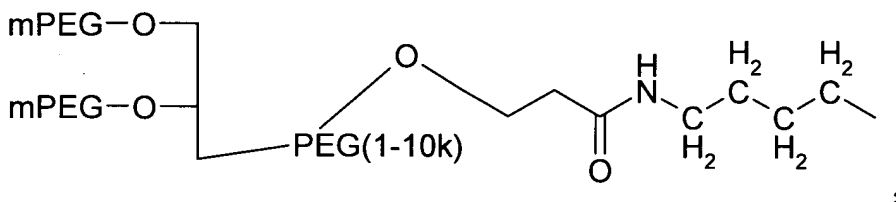
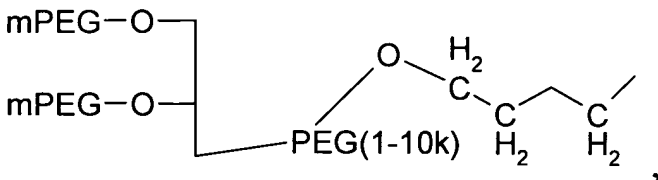
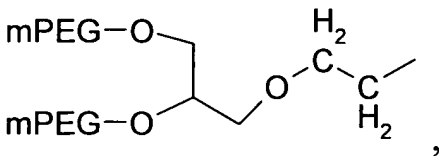
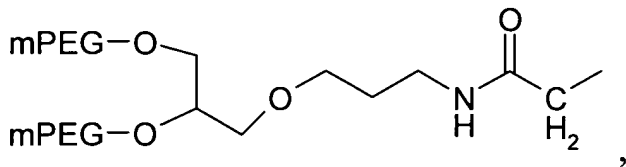
D representa -O- ou uma ligação;

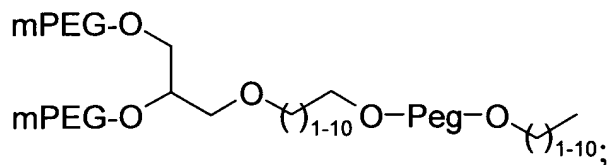
R representa C₁₋₆alquilenos, -(CH₂)₄-CH(NH₂)-CO-NH-CH₂-, -(CH₂)₄-CH(NHCOCH₃)-CO-NH-CH₂-, ou C₅₋₁₅heteroalquilenos;

A representa uma ligação oxima;

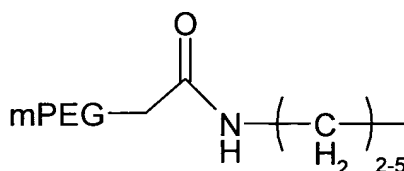
Z representa uma porção selecionada dentre







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



desde que se Z é H_2^{2-5} , então mPEG é 10 kDa mPEG.

37. Composto de acordo com a reivindicação 36, caracterizado
5 pelo fato de que D representa -O-.

38. Composto de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que D representa uma ligação única.

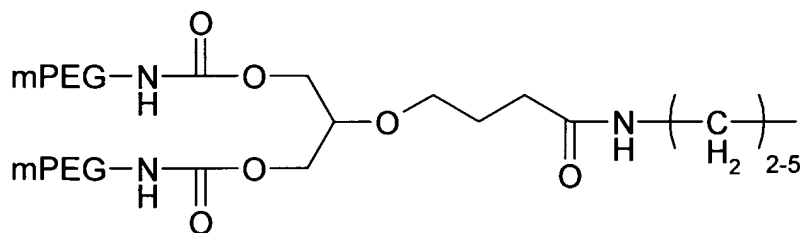
39. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, caracterizado pelo fato de que R representa $-(CH_2)_4-CH(NH_2)-CO-$ 10 $NH-CH_2-$ ou $-(CH_2)_4-CH(NHCOCH_3)-CO-NH-CH_2-$.

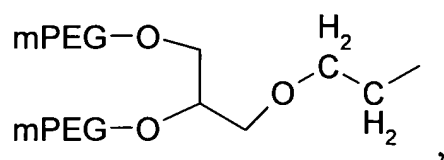
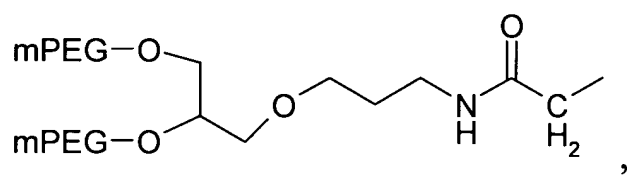
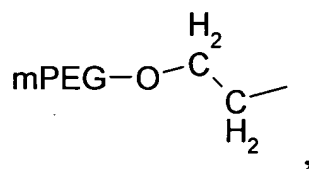
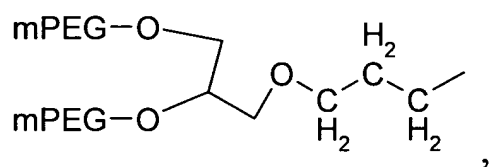
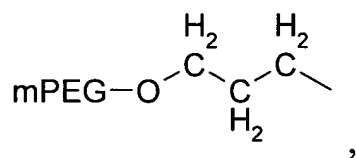
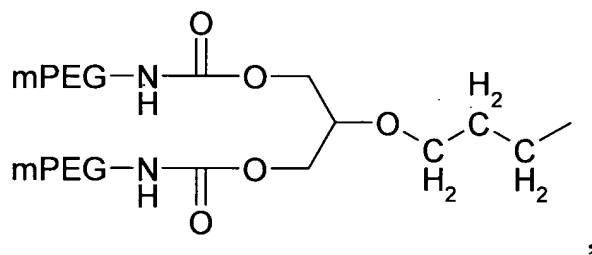
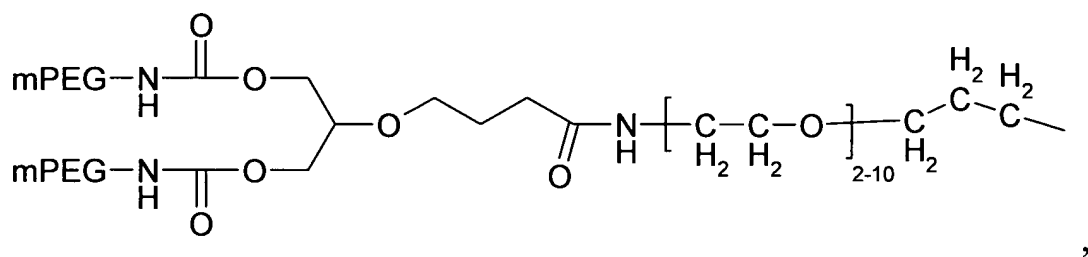
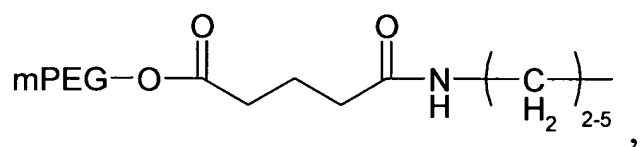
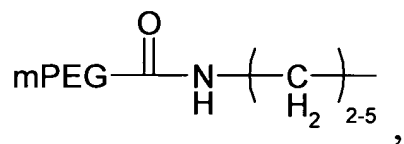
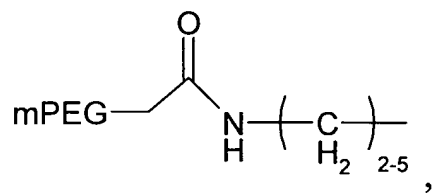
40. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 38, caracterizado pelo fato de que R representa C₁₋₆ alquilenos.

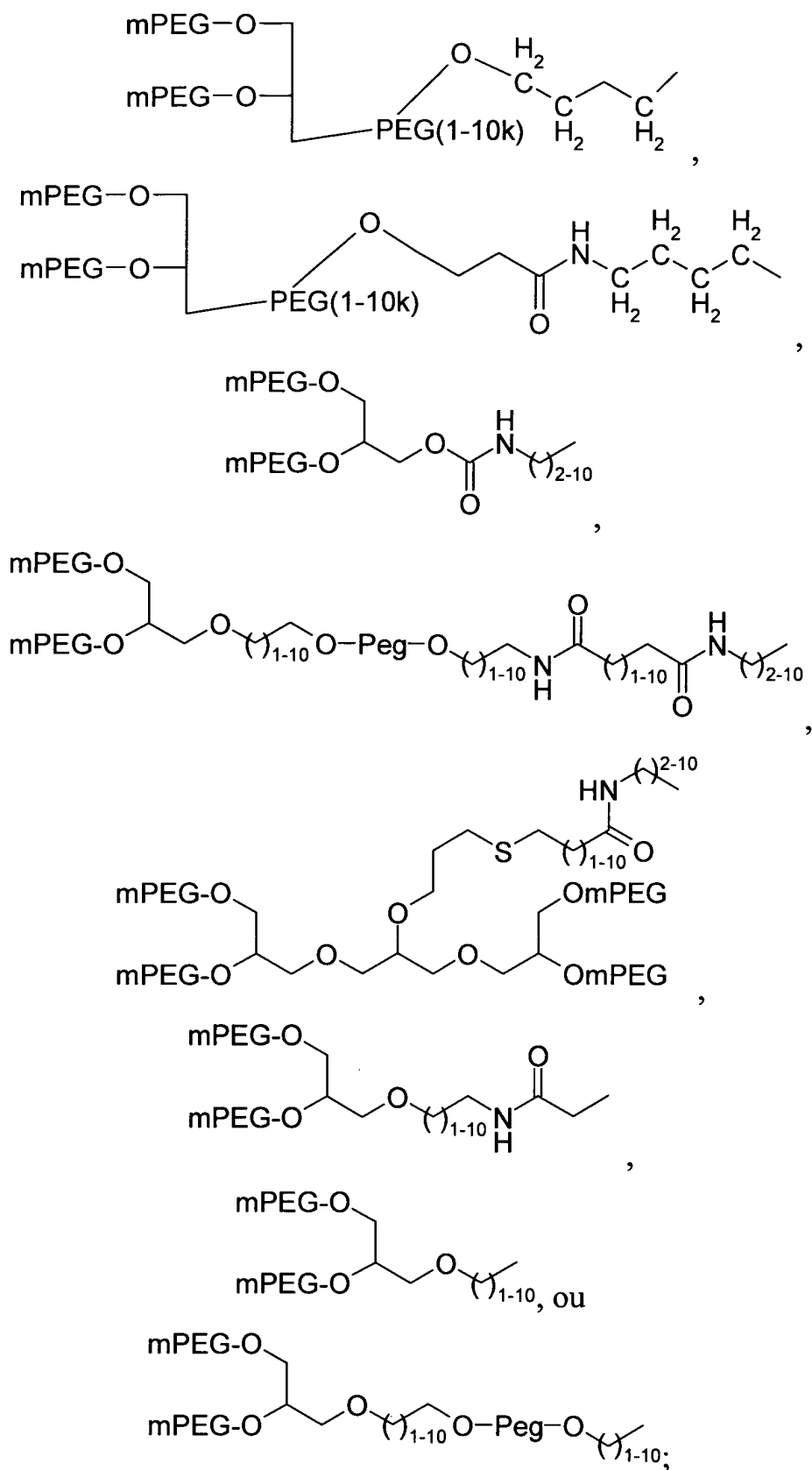
41. Composto de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que R representa C₁₋₃alquilenos.

15 42. Composto de acordo com a reivindicação 41, caracterizado
pelo fato de que R representa metileno ou propileno.

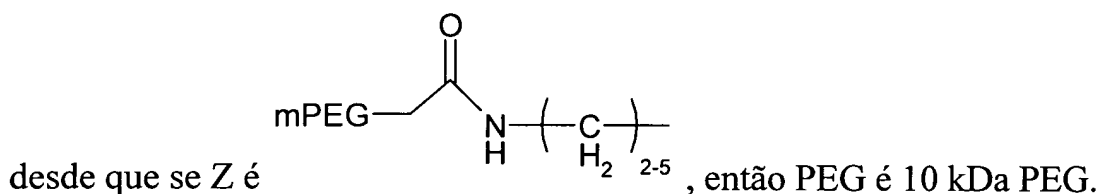
43. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 42, caracterizado pelo fato de que Z representa







em que, salvo indicado em contrário, mPEG indica um mPEG com um peso molecular de entre 5 kDa e 40 kDa e PEG indica um PEG com um peso molecular entre 1 kDa e 10 kDa;



44. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 43, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é um resíduo de glutamina compreendendo hormônio de crescimento e PP representa um radical de hormônio de crescimento obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes no hormônio de crescimento.

45. Composto de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em um hGH compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID No.1.

46. Composto de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de dois resíduos de glutamina presentes em 20 kDa hGH.

47. Composto de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, e da cadeia lateral do resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ da cadeia lateral de um outro resíduo de glutamina presente em uma posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 141 em SEQ ID No. 1, em que o resíduo de glutamina na posição correspondendo à posição 40 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outro aminoácido, e por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de um outro resíduo de glutamina presente em uma posição diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1;

ou

GH representa o radical obtido por remoção de $-C(=O)-NH_2$ da cadeia lateral de dois glutaminas presente em um hGH em posições diferente das posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1, em que qualquer resíduo de glutaminas presente nas posições correspondendo às posições 40 e 141 em SEQ ID No. 1 foi deletado ou substituído com outros aminoácidos.

48. Hormônio de crescimento humano, caracterizado pelo fato de ser covalentemente fixado a uma porção compreendendo PEG, e em particular mPEG, em que referido porção compreendendo PEG é fixada na cadeia lateral de resíduo de glutamina 40, na cadeia lateral de glutamina 141 ou nas cadeias laterais de glutamina 40 e glutamina 141 de hormônio de crescimento humano, desde que não seja

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(4-(4-(mPEG(20k)ilbutanoil)-amino-butiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ -[2-(1-(hexadecanoil)piperidin-4-il)etiloxiimino)-etil] hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(4-(1,3-bis(mPEG(20k)ilaminocarboniloxi)prop-2-iloxi)butirilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}$ (2-(4-(2,6-bis(mPEG(20k)iloxicarbonilamino)hexanoilamino)butiloxiimino)etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}(2-(4-(4-(mPEG(30k)iloxi)butirilamino)butiloxiimino)$
etil) hGH,

$N^{\epsilon 141}(2-(4-(4-(mPEG(20k)iloxi)butirilamino)butiloxiimino)$
etil) hGH, ou

5 $N^{\epsilon 141}(2-(4-(3-(mPEG(30k)iloxi)propanoilamino)butiloxiimino)$
etil) hGH.

49. Composto caracterizado pelo fato de ser obtido por uso de um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

10 50. Composto caracterizado pelo fato de ser obtível pelo uso de um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

51. Composto caracterizado pelo fato obtido por uso de um método como definido em qualquer uma das reivindicações 19 a 22.

52. Composto caracterizado pelo fato de ser obtível pelo uso de um método como definido em qualquer uma das reivindicações 19 a 22.

15 53. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 35, qualquer uma das reivindicações 44 a 52, reivindicação 51, ou reivindicação 52 caracterizado pelo fato de ser para uso em terapia.

20 54. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 35, qualquer uma das reivindicações 44 a 52, reivindicação 51, ou reivindicação 52.

25 55. Método para tratamento de doença, a dita doença sendo deficiência de hormônio de crescimento (GHD); Síndrome de Turner; Síndrome de Prader-Willi (PWS); síndrome de Noonan; síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatóide juvenil; fibrose cística, infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças baixas que cresceram baixas na idade gestacional (SGA); estatura baixa em crianças que nasceram com peso muito baixo (VLBW) mas SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa

idiopática (ISS); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tal como tibia, fibula, fêmur, úmero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso, e dígito; fraturas em ou de ossos espongiósos, tal como o remo, base de mão, e base do pé; pacientes após cirurgia dos tendões ou ligamentos em por exemplo mão, joelho, ou ombro; pacientes tendo ou passando através de osteogénese de distração; pacientes após substituição de bacia ou disco, reparo do menisco, fusões da espinha ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro, ombro, pulso ou maxilar; pacientes em que o material de osteosíntese, tal como pregos, parafusos e placas, foram fixados; pacientes com falta de união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo da tibia ou do primeiro dedo; pacientes após implante de enxertos; degeneração de cartilagem articular em joelho causado por trauma ou artrite; osteoporose em pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crónica (APCD); doença cardiovascular associada com má nutrição APCD; reversão de caquexia em APCD; cancro em APCD; doença pulmonar obstrutiva crónica em APCD; HIV em APCD; idosos com APCD; doença crónica do fígado APCD, síndrome de fadiga em APCD; doença de Crohn; função de fígado prejudicada; males com infeções por HIV; síndrome de intestino curto; obesidade central; síndrome de lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva principal, destoxificação de álcool/drogas ou trauma neurológico; envelhecimento; idosos frágeis; osteo-artrite; cartilagem traumáticamente danificada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; dano traumático ao cérebro; hemorragia subaracnóide; peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças; para aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; aceleração ou melhora do fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infeção em tecido danificado, o método

caracterizado pelo fato de compreender a administração, a um paciente em necessidade de uma quantidade eficaz, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 35, qualquer uma das reivindicações 44 a 52, reivindicação 51, ou
5 reivindicação 52 ou uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 54.

56. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 31 a 35, qualquer uma das reivindicações 44 a 52, reivindicação 51, ou reivindicação 52, caracterizado pelo fato de ser na
10 fabricação de um medicamento a ser usado no tratamento de deficiência de hormônio de crescimento (GHD); Síndrome de Turner; Síndrome de Prader-Willi (PWS); Síndrome de Noonan; Síndrome de Down; doença renal crônica, artrite reumatóide juvenil; fibrose cística, infecção por HIV em crianças recebendo tratamento HAART (crianças HIV/HALS); crianças
15 baixas que cresceram baixas na idade gestacional (SGA); estatura baixa em crianças que nasceram com peso muito baixo (VLBW) mas SGA; displasia esquelética; hipocondroplasia; acondroplasia; estatura baixa idiopática (ISS); GHD em adultos; fraturas em ou de ossos longos, tal como tíbia, fíbula, fêmur, úmero, rádio, ulna, clavícula, metacarpo, metatarso, e dígito; fraturas
20 em ou de ossos espongiosos, tal como o remo, base de mão, e base do pé; pacientes após cirurgia dos tendões ou ligamentos em por exemplo mão, joelho, ou ombro; pacientes tendo ou passando através de osteogênese de distração; pacientes após substituição de bacia ou disco, reparo do menisco, fusões da espinha ou fixação de prótese, tal como no joelho, quadril, ombro,
25 ombro, pulso ou maxilar; pacientes em que o material de osteossíntese, tal como pregos, parafusos e placas, foram fixados; pacientes com falta de união ou má união de fraturas; pacientes após osteotomia, por exemplo da tíbia ou do primeiro dedo; pacientes após implante de enxertos; degeneração de cartilagem articular em joelho causado por trauma ou artrite; osteoporose em

pacientes com síndrome de Turner; osteoporose em homens; pacientes adultos em diálise crônica (APCD); doença cardiovascular associada com má nutrição APCD; reversão de caquexia em APCD; câncer em APCD; doença pulmonar abstrativa crônica em APCD; HIV em APCD; idosos com APCD; doença crônica do fígado APCD, síndrome de fadiga em APCD; doença de Crohn; função de fígado prejudicada; males com infecções por HIV; síndrome de intestino curto; obesidade central; síndrome de lipodistrofia associada com HIV (HALS); infertilidade masculina; pacientes após cirurgia eletiva principal, destoxificação de álcool/drogas ou trauma neurológico; envelhecimento; idosos frágeis; osteo-artrite; cartilagem traumaticamente danificada; disfunção erétil; fibromialgia; distúrbios de memória; depressão; dano traumático ao cérebro; hemorragia subaracnóide; peso muito baixo no nascimento; síndrome metabólica; miopatia glucocorticóide; estatura baixa devido a tratamento com glucocorticóide em crianças; aceleração da cicatrização de tecido muscular, tecido nervoso ou feridas; aceleração ou melhora do fluxo sanguíneo para tecido danificado; ou a diminuição de taxa de infecção em tecido danificado.

RESUMO

“MÉTODOS PARA FIXAR COVALENTEMENTE PEG A UM
POLIPEPTÍDEO E PARA MODIFICAR PROPRIEDADES
FARMACOLÓGICAS DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO,
5 COMPOSTO E SAIS, PRÓ-DROGAS OU SOLVATOS
FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS DO MESMO, HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO HUMANO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA,
MÉTODO PARA TRATAMENTO DE DOENÇA, E, USO DE UM
COMPOSTO”

10 Método para PEGuilar hormônio de crescimento, referido
método compreendendo reagir hormônio de crescimento com uma amina
compreendendo nucleófilo que ainda compreende um primeiro grupo
funcional na presença de TGase para formar um hormônio de crescimento
transaminado, seguido por uma reação de referido hormônio de crescimento
15 transaminado com um PEG que foi funcionalizado com um segundo grupo
funcional, em que referido primeiro e segundo grupos funcionais são
selecionados de modo que eles reagem para formar uma ligação covalente.